

Aus der Abteilung Genvektoren des
Helmholtz-Zentrum München

Wissenschaftlicher Geschäftsführer: Prof. Dr. Günther Wess

**Die Bedeutung von G-Quadruplex Strukturen für die
Definition und Effizienz von
Replikationsursprüngen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Julia Katharina Damaschke

aus
Limburg an der Lahn

2016

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: PD. Dr. Aloys Schepers

Zweitgutachterin: Priv.Do. Dr. Barbara Adler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DNA STRUKTUREN UND CHROMATIN	1
1.2. DNA REPLIKATION	3
1.3. DNA-REPLIKATIONSURSPRÜNGE (ORIGINS)	4
1.3.1. LIZENZIERUNG DER REPLIKATIONSURSPRÜNGE	5
1.3.2. REPLIKATIONSURSPRÜNGE IN VERSCHIEDENEN ORGANISMEN	7
1.3.3. METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON REPLIKATIONS-URSPRÜNGEN IN HÖHEREN EUKARYONTEN	8
1.3.4. SELEKTION VON REPLIKATIONSURSPRÜNGEN IN HÖHEREN EUKARYONTEN	10
1.4. DAS EPSTEIN-BARR VIRUS - EIN MODELL FÜR DIE HUMANE DNA REPLIKATION	12
1.5. G-QUADRUPEX STRUKTUREN	16
1.5.1. DEFINITION	16
1.5.2. KONSEQUENZEN VON GENOMISCHEN G4-STRUKTUREN	18
1.5.3. G4-STRUKTUREN UND ZELLULÄRE PROZESSE	19
1.5.3.1. G4-Strukturen und Transkription	20
1.5.3.2. G4-Strukturen und DNA Replikation	21
1.6. ZIELSETZUNG	23
2. MATERIAL	24
2.1. GERÄTE	24
2.2. CHEMIKALIEN	26
2.3. MATERIALIEN	29
2.4. KITS	30
2.5. ENZYME/PROTEINE	31
2.6. PLASMIDE	32
2.7. OLIGONUKLEOTIDE	33
2.8. BAKTERIEN	37
2.9. ZELLINIEN	37
2.10. ANTIKÖRPER	38
3. METHODEN	39
3.1. ZELLBIOLOGISCHES ARBEITEN	39
3.1.1. KULTIVIERUNG VON ZELLEN	39
3.1.2. EINFRIEREN, AUFTAUEN UND AUFBEWAHRUNG VON ZELLEN	40

3.1.3.	TRANSFEKTION VON ADHÄRENTEN ZELLEN	40
3.1.4.	VERNETZEN VON PROTEIN-DNA/RNA INTERAKTIONEN IN ZELLEN (CROSSLINKEN)	42
3.1.5.	BESTIMMUNG DES WACHSTUMS UNTER TmPyP4	42
3.1.6.	FACS-ANALYSE	43
3.2.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	44
3.2.1.	BAKTERIENKULTUREN	44
3.2.2.	TRANSFORMATION VON CHEMISCH KOMPETENTEN ZELLEN	45
3.2.3.	PRÄPARATIVE PLASMIDREINIGUNG	45
3.2.4.	KLONIERUNG	45
3.2.4.1.	Restriktionsverdau	45
3.2.4.2.	Dephosphorylierung und Ligation	46
3.2.4.3.	Klonierung von cc2 500 bp G-Quadruplex Mutanten	46
3.2.4.4.	Multimerisierung von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 („Kopf-an-Schwanz Klonierung“)	47
3.2.4.5.	Klonierung von Oligonukleotiden in pJet 1.2 für die <i>in vitro</i> Transkription	48
3.2.5.	<i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION MIT UND OHNE RADIOAKTIVE MARKIERUNG	49
3.2.6.	BESTIMMUNG DER RELATIVEN KOPIENZAHLE DES EPSTEIN-BARR VIRUS GENOMS IN INFIZIERTEN ZELLEN	50
3.2.7.	QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (qPCR)	51
3.2.8.	DER PLASMID-WIEDERGEWINNUNGSVERSUCH	52
3.3.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	55
3.3.1.	KOVALENTE KOPPLUNG DES ORC3 ANTIKÖRPERS AN SEPHAROSE A KÜGELCHEN (BEADS)	55
3.3.2.	ORC „PULL-DOWN“	55
3.3.3.	IMMUNBLOT	56
3.3.4.	ELEKTROMOBILITY-SHIFT-ASSAY (EMSA)	57
3.3.5.	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (ChIP)	58
3.3.6.	RIBONUKLEOPROTEIN-IMMUNPRÄZIPITATION (RIP) FÜR DIE „HIGH-THROUGHPUT“ SEQUENZIERUNG VON RNAs	60
4.	ERGEBNISSE	64
4.1.	DIE ROLLE VON RNAs UND RNA G-QUADRUPLEX STRUKTUREN IN DER EBNA1-ORC INTERAKTION	64
4.1.1.	EINFLUSS VON G4-STRUKTUREN AUF DIE EBV-REPLIKATION <i>IN VIVO</i>	65
4.1.2.	CHARAKTERISIERUNG DER EBNA1-EBER1-ORC INTERAKTION	72
4.1.2.1.	EBER1-Konstrukte für die Untersuchung der EBNA1-EBER1 Interaktion <i>in vitro</i>	72
4.1.2.2.	EBNA1 interagiert spezifisch mit EBER1 (b 1-167)	76
4.1.2.3.	EBNA1 bindet Struktur-abhängig an EBER1	80

4.1.2.4.	Die EBNA1-EBER1 Interaktion ist G4-unabhängig	81
4.1.2.5.	Die EBNA1-ORC Interaktion wird in Anwesenheit von EBER1 <i>in vitro</i> signifikant erhöht	82
4.1.3.	DIE ROLLE DER EBER-RNAS IN DER EBV-REPLIKATION <i>IN VIVO</i>	84
4.1.4.	IDENTIFIZIERUNG VON SPEZIFISCHEN RNAS FÜR DIE EBNA1-ORC INTERAKTION	90
4.2.	DIE ROLLE VON G-QUADRUPLIX MOTIVEN AUF DIE REPLIKATION VON REPLIKATIONSURSPRÜNGEN IM PLASMID-SYSTEM	94
4.2.1.	DER PLASMID-WIEDERGEWINNUNGSVERSUCH	95
4.2.2.	GENERIERUNG VON MUTANTEN DES CC2 500 ORIGINS ZUR UNTERSUCHUNG DER REPLIKATIONSEFFIZIENZ IN ABHÄNGIGKEIT DER LÄNGE, ORIENTIERUNG UND G4-MOTIVEN	97
4.2.3.	DIE REPLIKATIONSEFFIZIENZ VON CC2 UND CC4 ORIGINS HÄNGT VON DER LÄNGE UND DER ORIENTIERUNG DES ORIGINS IM PLASMID AB	100
4.2.4.	EINE KOOPERATIVE WECHSELWIRKUNG DER G4-MOTIVE BEWIRKT DIE EFFIZIENTE REPLIKATION DES CC2 500 ORIGINS	101
4.2.5.	EINE MULTIMERISIERUNG VON CC2 500 UND CC2 500 DELTA G4#1 STEIGERT NICHT DEREN REPLIKATIONSEFFIZIENZ	103
4.2.6.	PROTEINE DER REPLIKATIONSMASCHINERIE BINDEN NICHT SPEZIFISCH AN DIE G4-MOTIVE DES CC2 500 ORIGIN	105
5.	<u>DISKUSSION</u>	111
5.1.	DIE ORC-CHAPERON INTERAKTION	112
5.1.1.	DIE ROLLE VON RNA G4-STRUKTUREN IN DER ORC-REKRUTIERUNG AN DS	112
5.1.2.	DIE EBNA1-EBER1 INTERAKTION <i>IN VITRO</i>	115
5.1.3.	DIE EBNA1-ORC-EBER1 INTERAKTION <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>	118
5.1.4.	DIE ROLLE VON ZELLULÄREN RNAS IN DER ORC-CHAPERON INTERAKTION	120
5.2.	UNTERSUCHUNG DER EFFIZIENZ VON REPLIKATIONS-URSPRÜNGEN HINSICHTLICH G4-STRUKTUREN IM PLASMID-SYSTEM	122
5.2.1.	CHARAKTERISIERUNG VON CC2 UND CC4 IM ORI ^P -PLASMID-SYSTEM	122
5.2.2.	DER EINFLUSS DER G4-MOTIVE AUF DIE REPLIKATION VON CC2 500 IM PLASMID-SYSTEM	126
5.2.3.	EINFLUSS DER MULTIMERISIERUNG AUF DIE REPLIKATIONS-EFFIZIENZ VON CC2 500 BP	128
5.2.4.	FAKTOREN, DIE DIE AKTIVITÄT VON ORIGINS IM PLASMID-SYSTEM BEEINFLUSSEN	129
5.2.5.	UNTERSUCHUNG DER ASSOZIATION VON ORC UND MCM2-7 AN DIE G4-MOTIVE DER CC2 500 BP SEQUENZ	132
5.3.	MODELLE HINSICHTLICH DER ROLLE VON G4-STRUKTUREN IN DER DNA REPLIKATION	134
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	137
6.1.	ZUSAMMENFASSUNG	137

6.2. SUMMARY	139
<u>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>141</u>
<u>8. ANHANG</u>	<u>158</u>
8.1. VORHERSAGE VON TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDESTELLEN	158
8.2. LEBENSLAUF	160
8.3. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	161
8.4. DANKSAGUNG	162

1. Einleitung

1.1. DNA Strukturen und Chromatin

Während seiner Untersuchung der chemischen Zusammenstellung von Zellen in den 1860er Jahren entdeckte Friedrich Miescher Nuklein als einen wichtigen Teil des Zellkerns [1]. Von der Entdeckung der DNA bis zur Beschreibung der Struktur und der Funktion der DNA als Träger der Erbinformation durch Oswald Avery dauerte es jedoch fast ein Jahrhundert [2]. Erst im Jahr 1953 stellten Watson und Crick das Modell der doppelsträngigen rechts-gängige DNA–Doppelhelix vor, die auch als B-Form DNA bezeichnet wird [3].

DNA ist durch die vier Nukleotide Adenosin-, Guanosin-, Cytidin- und Thymidintriphosphat aufgebaut, die nach der Regel für die Basenpaarung wie folgt miteinander wechselwirken: Thymin mit Adenin, Cytosin mit Guanin. Ein Nukleotid setzt sich aus jeweils einer der Nukleinbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin und einem Ribose-Phosphat-Rückgrat zusammen [4]. Der Zusammenbau der DNA erfolgt durch eine Phosphodiesterbindung der freien Hydroxylgruppe des Zuckermoleküls am 3'-Ende mit der Phosphatgruppe am 5'-Ende. Einzelsträngige DNA besitzt aufgrund dieses Aufbaus eine Polarität.

Die B-Form ist die *in vivo* am häufigsten vorkommende DNA Struktur. Neben ihr können jedoch weitere Konformationen ausgebildet werden, die als Nicht-B-Form Strukturen beschrieben werden. Aussagen über Nicht B-Form Strukturen der DNA resultierten ursprünglich aus biophysikalischen Methoden *in vitro* [5]. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei diesen Strukturen um *in vitro* Artefakte handelt. Jedoch zeigten Korrelationsstudien, dass DNA-Sequenzen, für die diese Strukturen vorausgesagt wurden, evolutionär in verschiedenen Organismen konserviert sind. Weitere Studien deuten auf Funktionen dieser von Nicht B-Form-DNA *in vivo* hin [6]. Gut charakterisierte nicht B-Form Strukturen der DNA sind unter anderem Z-DNA, Kreuzform-und Triplex DNA, sowie die der G-Quadruplex (G4) Strukturen. Letzt genannte Strukturen sind dreidimensionale helikale Strukturen, die sich aus bis zu vier DNA Strängen zusammensetzen. Auf G4-Quadruplex Strukturen wird im Kapitel 1.5 näher eingegangen. Für viele der Nicht-B-Form DNA Strukturen wurde zudem

gezeigt, dass die Auflösung wichtig für die Genomintegrität ist, da bei Nicht-Auflösung das Risiko von Doppelstrangbrüchen steigt [6].

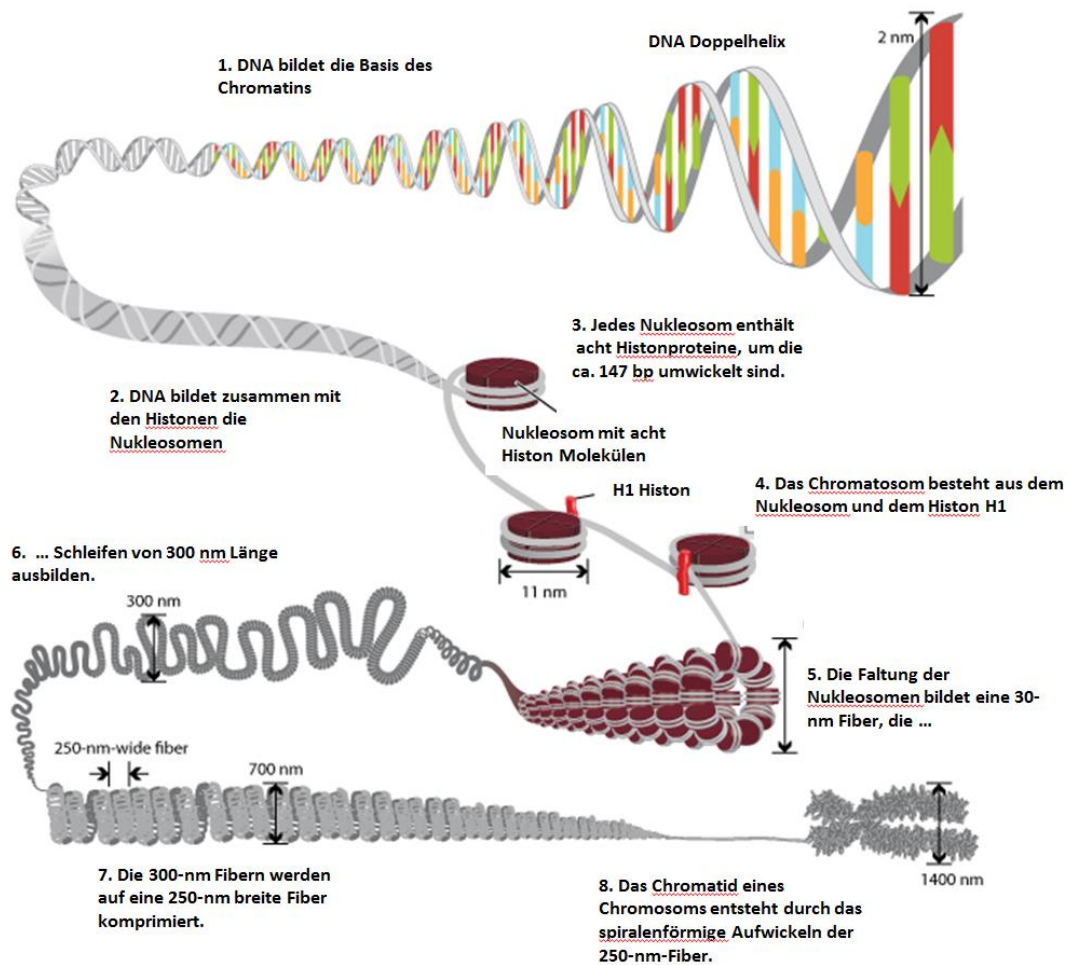


Abb.1.1: Aufbau des Chromatins (Abbildung aus [7], modifiziert).

DNA liegt im Zellkern von eukaryontischen Zellen nicht als reine Nukleotidsequenz sondern in Form von Chromatin vor. Als Chromatin wird der Komplex aus DNA und einem Histonkomplex bezeichnet. Je ca. 147 bp der DNA ist um ein Oktamer aus Histonproteinen gewickelt und bildet auf diese Weise ein Nukleosom (Abb.1.1). Der Oktamer-Komplex setzt sich aus einem Tetramer der Histone H3 und H4 und 2 Dimeren der Histone H2A und H2B zusammen. Nukleosomen sind kettenförmig auf den DNA Strängen aneinandergereiht und haben einen Durchmesser von etwa 10 Nanometern (nm). Daher spricht man hier auch von der 10-nm-Fiber. Deren Struktur wird oft mit einer Perlenkette verglichen („pearls-on-a-string“). Mit Hilfe von einem weiteren Histon, dem Histon H1, bzw. Histon-ähnlichen Molekülen wird die 10-nm-Fiber zu 30-nm-Fiber verdichtet. Den Vorgang der Verkürzung der chromosomalen

DNA-Stränge wird als Kondensation bezeichnet und bewirkt, dass die Länge der DNA-Stränge um das ca. 10.000- bis 50.000-fache verkürzt werden, so dass sie in Form der Chromosomen in den Zellkern passen. Nukleosomen sind sehr dynamisch, so dass DNA trotz der hohen Verdichtung weiterhin zugänglich ist, eine Voraussetzung dafür, dass nukleäre Prozesse wie Transkription und DNA-Replikation möglich sind.

1.2. DNA Replikation

Die Verdoppelung der DNA während der Zellteilung, wird DNA Replikation genannt. DNA Replikation unterliegt einer strikten Regulation und Zellzyklus-Abhängigkeit. Fehler in der DNA Replikation können zu Genom-Instabilität führen, welche mit einer Reihe an Krankheiten einschließlich Krebs assoziiert ist. Daher ist es wichtig die Regulationsprinzipien der Replikation zu verstehen, um Erkenntnisse darüber zu erlangen, wie Zellen die Integrität des Genoms erhalten.

Der Prozess der DNA Replikation und die daran beteiligten Enzyme sind gut untersucht. Zunächst wird der DNA Doppelstrang durch die DNA Helikase entwunden. Topoisomerasen laufen vor der Replikationsgabel und unterstützen die Entwindung der DNA durch Reduzierung von Torsionsspannungen, die bei der Entwindung der DNA entstehen. Je nach Topoisomerase-Typ werden gezielt Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche generiert, die nach der dem Torsionsspannungsabbau von der Topoisomerase wieder verknüpft werden. Die durch die Helikasen freigelegten einzelsträngigen DNA-Segmente werden durch das Einzelstrang-bindenden Protein stabilisiert. Die DNA Synthese ist ein unidirektionaler Prozess, die in 5'- 3'-OH Richtung am sogenannten Matrizenstrang kontinuierlich, abläuft. Die an der DNA Synthese beteiligten DNA-Polymerasen benötigen einen Primer, da sie keine *de novo* Syntheseaktivität besitzen. Deshalb wird zu Beginn der Replikation von der DNA Primase, die RNA Polymerase Aktivität besitzt, ein RNA-Primer synthetisiert, der für die DNA Polymerase eine freie 3'-Hydroxylgruppe zur Verfügung stellt. Die DNA Primase ist mit der DNA Polymerase α assoziiert, um sowohl am Leit- als auch am Folgestrang die DNA Synthese zu initiieren [8]. Zunächst wurde angenommen, dass die DNA Polymerase ε für die Elongation am

Leitstrang und die DNA Polymerase δ für diejenige am Folgestrang verantwortlich ist. Später wurde gezeigt, dass für die DNA-Synthese des Leitstrang durch die DNA-Polymerase δ erfolgt [9]. Während der Elongationsphase ist die DNA-Polymerase mit dem Prozessivitätsfaktor PCNA (proliferating cell nuclear antigen) assoziiert, der verhindert, dass die Polymerase von der DNA dissoziiert. Am Folgestrang wird die neue DNA in Form von kleinen DNA-Fragmenten, den Okazaki-Fragmenten synthetisiert. Diese werden durch die DNA Ligase zu einem langen kontinuierlichen DNA Strang zusammengefügt, nachdem die RNase H die Primer-Sequenz entfernt und die DNA Polymerase δ die fehlenden Nukleotide eingesetzt hat [8].

1.3. DNA-Replikationsursprünge (Origins)

DNA Replikation initiiert im Genom an funktionell definierten Stellen, den Replikationsursprüngen (Origins). Diese werden von spezifischen Proteinen erkannt. Durch Rekrutierung weiterer Faktoren werden die Origins für DNA Replikation lizenziert, d.h. als replikationskompetent markiert. Die Proteine, die für die Replikationsinitiation eine Rolle spielen sind von Hefe bis zum Menschen konserviert. Die funktionelle Definition eines Origins ist einfach, jedoch aufgrund der Flexibilität an beteiligten Faktoren in höheren Eukaryonten nicht einfach zu charakterisieren. Sowohl die DNA-Sequenz und -Struktur als auch der epigenetische Kontext beeinflussen sowohl die Lizenzierung sowie die Aktivierung des jeweiligen Origins.

Die Replikationsinitiation lässt sich in zwei Schritte unterteilen: Erstens, die Lizenzierung von Replikationsursprüngen in der G1-Phase des Zellzyklus und zweitens, die Aktivierung der Origins in der S-Phase. Die zeitliche Trennung von Lizenzierung und Aktivierung gewährleistet, dass Replikation nur einmal pro Zellzyklus stattfindet. Der prä-Replikationskomplex (pre-RC) der sich an Origins in der G1-Phase assembliert (Lizenzierung), ist Voraussetzung für die potentielle Aktivierung des einzelnen Origins in der S-Phase.

Obwohl Origins in den verschiedenen eukaryontischen Spezies sehr unterschiedlich aufgebaut sind, sind die biologischen Prozesse bei der Origin-Erkennung und Aktivierung konserviert. Die reicht von der Initialen Erkennung durch ORC, über die Lizenzierung durch den pre-RC in der G1-Phase bis hin zur Origin-Aktivierung in der

S-Phase. Diese Vorgänge werden in den folgenden Kapiteln beschrieben. Außerdem werden Faktoren für die Origin-Lizenzierung in höheren Eukaryonten skizziert. Danach wird das Epstein-Barr Virus als ein Modell zur Untersuchung humaner Replikationsursprünge vorgestellt. Schließlich folgt ein Kapitel über G4-Strukturen und ihre Rolle in zellulären Prozessen. Danach wird auf die Rolle von G4-Strukturen in der DNA Replikation im Speziellen eingegangen.

1.3.1. Lizenzierung der Replikationsursprünge

Die bahnbrechende Arbeit von Huberman und Riggs postulierte schon 1966 anhand von Autoradiographie von Chromatin-Strängen ca. 30.000 bis 50.000 aktive Replikationsursprünge pro Hamsterzelle [10]. In Zeiten der „High-Throughput“ Technologie haben verschiedene Laboratorien genomweite Sequenzierungen zur Identifizierung aktiver Origins in verschiedenen humanen Zelllinien durchgeführt. Dabei rangiert die Anzahl der identifizierten aktiven Replikationsursprünge innerhalb einer Zellpopulation zwischen ca. 150.000 bis 250.000 [11-13]. Diese Zahl ist deutlich höher als die postulierte Zahl von Origins pro einzelner Zelle. Dies deutet auf eine Flexibilität in der Wahl der Origins in einzelnen Zellen hin. Dies beinhaltet, dass in der G1-Phase mehr Origins pro Zelle lizenziert werden, als in der folgenden S-Phase aktiviert werden. Somit wird nur eine Teilmenge der lizenzierten Origins pro Zelle verwendet, wie Studien in Säuger- und in Hefezellen belegen [14-16]. Zwischen unterschiedlichen Zelltypen kann die Wahl der Origins variieren. Das Set aktiver Origins kann selbst innerhalb der gleichen Zellpopulation sehr unterschiedlich sein. Die Origins die in der G1-Phase lizenziert werden aber in der S-Phase nicht aktiviert werden, die sogenannten „Dormant Origins“ sind bei replikativem Stress von Bedeutung [17-19].

Die Lizenzierung der Origins ist durch das sequentielle Binden verschiedener Proteinkomponenten charakterisiert. Als erstes bindet der Origin-Erkennungs-Komplex (ORC), ein hexamerer Proteinkomplex (Orc1-6), an die DNA-Zielsequenz in der G1-Phase des Zellzyklus [20,21]. Danach wird der Zellzyklus-regulierte Faktor Cdc6 an ORC rekrutiert. Mit Hilfe des Kofaktors Cdt1 wird dann der „Mini-Chromosome-Maintenance“-Komplex (MCM2-7) unter ATP-Verbrauch auf die DNA geladen [20-22]. Der MCM2-7 Komplex ist die enzymatische Untereinheit der

replikativen Helikase. Diese Faktoren bilden zusammen den pre-RC an potentiellen Replikationsursprüngen (Abb. 1.2).

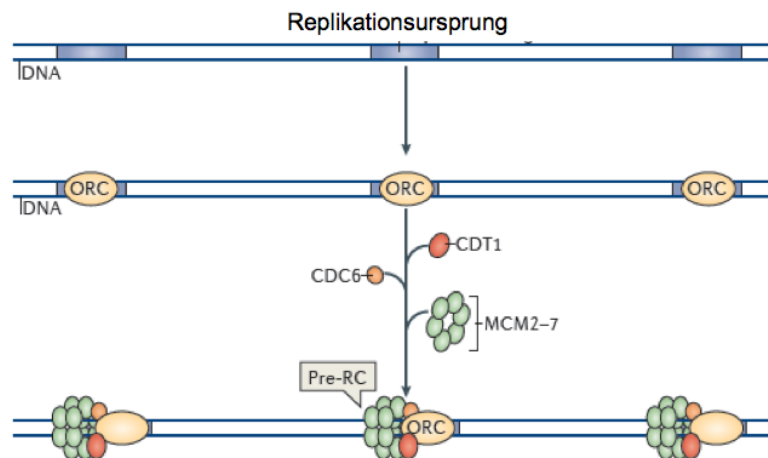


Abb. 1.2: Bildung des prä-Replikationskomplex (pre-RC) an Replikationsursprüngen. Blaue Bereiche stellen die Replikationsursprünge dar, die ORC in der G1-Phase bindet. Der Origin wird mit einer weiteren Rekrutierung der Replikationsproteine CDT1, CDC6 und MCM2-7 lizenziert. Zusammen bilden die Proteine den pre-RC (Abbildung aus [23], modifiziert).

Aktiviert wird der pre-RC schließlich in der S-Phase durch die S-Phase CDKs und die Dbf4-abhängigen Kinase DDK [24,25]. Um die Helikase-Aktivität des MCM2-7-Komplex zu aktivieren und die DNA-Polymerasen zu rekrutieren, bedarf es der Kinase-abhängigen Bindung weiterer Komponenten wie Dpb11, GINS, Cdc45, Sld2, Sld3 und Mcm10 [24-26].

1.3.2. Replikationsursprünge in verschiedenen Organismen

In allen eukaryonten Organismen sind die Proteinfaktoren für die Origin-Lizenzierung konserviert, jedoch unterscheidet sich die Spezifität von ORC für seine Zielsequenzen.

In Bakterien ist das einfache Modell der DNA Replikation zu finden. Dieses geht auf das Replikon-Modell von Jacob und Brenner zurück [27]. Ein Replikationsursprung wird hier als ein spezifisches genetisches Element, bezeichnet als Replikator, an dem durch Binden eines *trans*-Faktors (Initiator) Replikation initiiert wird. Das Modell wurde für *Escherichia coli* postuliert und bestätigt. Das Protein DnaA erkennt und bindet auf dem bakteriellen Genom eine spezifische Sequenz, die DnaA Boxen. Mit der Rekrutierung anderer Faktoren bildet sich das Replisom und DNA Replikation wird initiiert [28].

Replikationsursprünge in Eukaryonten wurden zuerst für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Sie wurden als funktionelle autonom-replizierende Sequenzen (ARS) in Plasmiden identifiziert [29,30]. Sequenzanalysen führten zur Beschreibung von mehreren genetische Elemente, die zur Replikationsfunktion beitragen [31,32]. Ein ca. 12-17 bp langes Motiv, charakterisiert durch einen T-reichen Strang, das in allen ARS konserviert ist, wurde als ARS-Consensus-Sequenz (ACS) definiert [33-35]. ACS ist essentiell für die Replikationsfunktion, aber nicht ausreichend. Die sogenannte A und B1-Domäne sind Bindestellen von ORC, während die anderen B-Elemente B2 und B3 als „Enhancer“ Bereiche für die Replikationseffizienz dienen [36-38].

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* sind Replikationsursprünge in der Spaltheefe *Saccharomyces pombe* und in Metazoen nicht durch definierte Konsensus-Elemente gekennzeichnet [39,40]. Vielmehr kennzeichnen sie sich durch einen 0,5 bis 3 kb großen genomischen Bereich aus, der reich an AT-Sequenzen ist [41-43].

Die Bindung von ORC an die Zielsequenz wird über die Orc4-Untereinheit vermittelt. Es wurde gezeigt, dass Orc4 über seine einzigartigen neun N-terminalen „AT-hook“ Motive, AT-reiche Sequenzen bindet und Replikationsursprünge in *S. pombe* auf die Weise markiert werden [44].

In höheren Eukaryonten kann die Initiation der Replikation an definierten Stellen oder über breite Initiationszonen hinweg erfolgen [12,45,46]. Gut charakterisierte spezifische Origins stellen u.a. der Lamin B2 und der β -Globin Locus in humanen

Zellen dar [47]. Mehrere Replikationsinitiationsstellen findet man hingegen in einer 55 kbp großen Zone unterhalb des Dihydrofolat-Reduktase-Gens (DHFR) [48]. Die Möglichkeiten für die Rekrutierung von ORC an seine Zielsequenzen sind in höheren Eukaryonten sehr flexibel. Hier hat der Komplex im Gegensatz zu ORC aus *S. cerevisiae* keine DNA-Sequenzspezifität *in vitro* und bindet für die Replikationsfunktion kein bestimmtes DNA-Konsensus-Motiv [49,50].

1.3.3. Methoden zur Untersuchung von Replikationsursprüngen in höheren Eukaryonten

Um Replikationsursprünge im Genom höherer Eukaryonten zu identifizieren und zu charakterisieren macht sich die Forschung die Fortschritte der letzten Jahre in der genomweiten Sequenzierungstechnologie zu Nutzen. Das verhalf der Forschung zu einem Sprung der Analysemöglichkeit nicht nur von ein paar wenigen Replikationsursprüngen, sondern zu einer genomweiten Analyse von Origins. Aus den Sequenzierdaten lassen sich über bioinformatische Analysen Informationen über DNA-Sequenzen, Korrelation von Transkription und Replikation und Chromatinmodifikationen für Origins herleiten. Im Folgenden werden die Methoden dargestellt, die zu diesen neuen Erkenntnissen führen.

Short-Nascent-Strand Analyse

Die Identifikation aktiver Replikationsursprünge geht auf die Technologie der Short-Nascent-Strand (SNS) Analyse zurück. An den Replikationsursprüngen beginnt die DNA Polymerase die Synthese von DNA mit einem RNA Primer. Neu replizierte DNA Stränge, sogenannte „Nascent Strands“ werden an Origins symmetrisch und in beide Richtungen synthetisiert. Die Analyse der SNS erlaubt daher die Identifizierung aktiver Origins im Genom. Für die SNS Analyse wird die DNA aus proliferierenden Zellen isoliert. Nach Denaturierung wird die DNA der Größe nach fraktioniert. Bei der Isolierung entstehen aber auch durch DNA Brüche kurze Fragmente, die ähnlich groß sind wie die SNS Fragmente. Um die SNS zu reinigen kommt eine von zwei Methoden zur Anwendung.

Eine Methode nutzt die *in vivo* Markierung der DNA während der Replikation mit dem Thymidinanalog BrdU und anschließender Anti-BrdU-Immunpräzipitation [51].

Proliferierende Zellen werden mit Medium, das mit BrdU angereichert ist, kultiviert. BrdU wird während der Replikation in die neu synthetisierte DNA eingebaut. So können neu synthetisierte DNA, also auch Short Nascent Strands mittels Immunpräzipitation mit anti-BrdU Antikörper angereichert werden.

Bei der anderen Methode wird das Enzym Lambda-Exonuklease, eine 5'-Exonuklease, benutzt [52]. Das Enzym hat eine Selektivität für DNA aber nicht wenn die DNA mit RNA Primern gebunden ist. Daher verdaut dieses Enzym durch Brüche entstandene DNA Stücke, aber die neu replizierten SNS bleiben intakt.

Aufgereinigte SNS werden schließlich sequenziert und bioinformatisch mit der Genomsequenz verglichen, um dadurch die genomischen Positionen der aktiven Ursprünge zu identifizieren [11].

Chromatin-Immunpräzipitation

Eine andere Methode zur Identifizierung von Replikationsursprüngen stellt die Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender „High-Throughput“ Sequenzierung dar (ChIP-Seq). Proteine des pre-RC, wie ORC und MCM2-7, markieren potentielle Initiationsstellen für die Replikation und binden an die Origin-Sequenzen im Genom. Die Interaktion zwischen dem pre-RC und der Zielsequenz wird in der ChIP kovalent und reversibel verknüpft. Nach Immunpräzipitation der pre-RC Proteine wird die kopräzipitierte DNA-Sequenz isoliert und anschließend sequenziert. Somit kann eine Lokalisation von pre-RCs im Genom vorgenommen werden. Mit einer Korrelation von SNS Daten ergibt sich ein Bild, welche Origins in der Zelle nicht nur lizenziert sondern auch aktiviert werden. Durch einen Vergleich mit anderen ChIP-Seq Daten von Histonen, Histonmodifikationen und Transkriptionsfaktoren können Erkenntnisse über die epigenetischen Faktoren erhalten werden, die die pre-RC Bildung beeinflussen [12].

Das nächste Kapitel beschreibt, welche Faktoren für die Selektion von Replikationsursprüngen in höheren Eukaryonten eine Rolle spielen können.

1.3.4. Selektion von Replikationsursprüngen in höheren Eukaryonten

Bestimmte Elemente des Chromatins beeinflussen die Origin-Selektion in höheren Eukaryonten, die durch spezifische DNA-Elemente und epigenetische Faktoren des Chromatins beeinflusst wird.

Verschiedene Histonmodifikationen können eine Rolle spielen. Beispielsweise wurde postuliert, dass eine Acetylierung von H3 und H4 in einer Steigerung der Replikationsaktivität resultiert [53]. Eine weitere Modifizierung, die an einigen humanen Replikationsursprüngen detektiert wird ist die Mono-Methylierung an der Aminosäure Lysin 20 des Histons 4 (H4K20). Die Rekrutierung der entsprechenden Methyltransferase, PR-Set7, an einen definierten genomischen Locus bewirkt die Ausbildung des pre-RC [54]. ORC interagiert auch mit den repressiven Histonmodifikationen H3K9me3, H3K27me3 und H4K20me3 [55,56], die vermutlich eine Rolle bei der Lizenzierung des pre-RCs im Heterochromatin spielen.

ORC-DNA-Bindung korreliert häufig mit Transkriptionsstartstellen von aktiv-transkribierten Regionen und deshalb wird ein räumlicher Zusammenhang zwischen dem Transkriptions- und Replikationsvorgang gesehen [57,58]. Aktiv transkribierte Bereiche stellen eine leicht zugängliche Chromatin-Umgebung dar, die die Replikation begünstigen kann [59]. Studien zeigen, dass in Säugerzellen GC-reiche Bereiche wie CpG-Regionen (CpG-Islands) mit Replikationsursprüngen korrelieren [60-62]. Dafür spricht, dass viele Promotorregionen sowie Origins mit CpG-Islands korrelieren, jedoch sind Origins zusätzlich bei CpG-Islands zu finden, die nicht in Promotor-Sequenzen liegen [63].

Immer weiter verbreitet sich auch die Annahme, dass nicht-kodierende kleine RNAs (ncRNA) die Replikationsfunktion einiger Origins steuern. Zang et al., (2011) und Collart et al., (2011) beschrieben die in Vertebraten als Y RNAs bezeichneten ncRNAs, die eine Rolle bei der Initiation der DNA Replikation spielen [64,65]. Y RNAs assoziieren vor der Initiation der Replikation in der G1-Phase mit Chromatin [66]. Da eine Interaktion von ORC mit den Y RNAs *in vitro* gezeigt wurde, wird postuliert, dass die Y RNAs in der Spezifizierung und/oder in der Aktivierung von Origins beteiligt sind [65].

Für lange Zeit stellte die große Anzahl von Origins in Eukaryonten ein Hindernis für deren Identifizierung dar. Seit verbesserten genomweiten Analysemethoden und

„High-Throughput“ Verfahren ist es möglich die Origin-Selektion weiter auf Sequenz-Spezifität zu untersuchen. Eine Präferenz von früh-replizierenden Origins zu unmethylierten und spät-replizierenden Origins zu methylierten CpG-Islands wurde dabei beobachtet [67]. Aus bioinformatischen Analysen in Maus, Drosophila und humanen Zellen wurden Replikationsursprünge mit Guanin-reichen Elementen („G-rich repeated elements“) korreliert, die das Potential zur Bildung von viersträngigen helikalen Strukturen, den sogenannten G4-Strukturen besitzen [12,14]. Die Annahme ist, dass diese Strukturen sowohl die Position als auch die Effizienz von Origins bestimmen können [68]. Die Mechanismen, für die Funktionalität von G4-Strukturen sind bisher noch nicht verstanden, rücken weiter ins Interesse der Forschung, um zu verstehen, wie Origins in höheren Eukaryonten reguliert werden. Auf weitere Studien, die den Zusammenhang zwischen G4-Strukturen und DNA Replikation demonstrieren, wird im Kapitel 1.3.3.2 dieser Arbeit näher eingegangen.

Vor kurzem wurden zudem aus „Short-Nascent-Strand“-Analysen an den Replikationsinitiationsstellen in humanen Zellen AC/TG-reiche Bereiche detektiert während poly-T sowie poly-A reiche Sequenzen an diesen Stellen unterrepräsentiert sind [12].

Eine weitere Alternative zur Origin-Selektion stellen Chromatin- bzw. DNA-bindende Proteine dar, die mit ORC interagieren und ihn somit zu seinen Zielsequenzen lotsen. Diese Proteine werden auch als ORC-Chaperone bezeichnet. Dazu zählen einige Transkriptionsfaktoren, wie Myc, E2F1, Rb und Myb, die mit ORC kolokalisieren [69-71]. Eine Vermutung ist, dass Transkriptionsfaktoren durch Einwirkung auf die Chromatin-Umgebung sowohl einen aktivierenden als auch reprimierenden Einfluss auf die Replikationsinitiation nehmen können [72]. Auch Proteine des Heterochromatins stellen Interaktionspartner von ORC dar. Dazu gehört das Heterochromatin-Protein 1 alpha (HP1alpha) und das „High-mobility-group“ A1-Protein (HMGA1a) [73,74]. Eine Hypothese ist, dass durch die Interaktion von ORC mit diesen Proteinen Replikationsursprünge des Heterochromatins gekennzeichnet werden [73,75]. Dieses Prinzip wird auch im viralen Kontext des Epstein-Barr Virus (EBV) sowie im Fall des Kaposi's-Sarkom-assoziierten Virus (KSHV) genutzt. ORC wird dabei über die viralen Kernproteine EBNA1 und LANA an den jeweiligen Replikationsursprung der Virus-DNA rekrutiert und die latente virale Replikation initiiert [76,77].

1.4. Das Epstein-Barr Virus - ein Modell für die humane DNA Replikation

Das Epstein-Barr Virus (EBV) gehört zur Familie der gamma-Herpesviren. Nach der Infektion persistiert das Virus latent als extrachromosomale DNA in den B-Zellen des Wirts. Das EBV-Genom ist in Nukleosomen verpackt und seine latente Replikation findet Zellzyklus-abhängig in der S-Phase statt [78,79].

B-Zellen, die mit EBV-infiziert wurden werden als lymphoblastoide Zelllinie (LCL) bezeichnet und sind durch EBV immortalisiert, d.h., dass eine kontinuierliche Proliferation infizierter Zellen sichergestellt und Apoptose umgangen wird. LCLs exprimieren nur eine Teilmenge der viralen Gene, damit das Virus dem Immunsystem des Wirts ausweichen kann. Unter ihnen sind die Kernproteine EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA-LP sowie die Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B. Neben 44 micro RNAs werden außerdem die kleinen nicht-kodierenden RNAs EBER1 und EBER2 exprimiert [80-82].

In den folgenden Kapiteln werden der latente Replikationsursprung OriP und das viral exprimierte Protein EBNA1 bezüglich der Replikationsfunktion von EBV näher beschrieben. Außerdem werden die viralen RNAs EBER1 und EBER2 sowie das OriP Plasmid-System vorgestellt.

Der latente Replikationsursprung OriP

Der latente Replikationsursprung OriP ist das einzige *cis*-Element, das essentiell für den Erhalt des EBV-Genoms in der Zelle ist [83] (Abb.1.3A). Er setzt sich aus zwei Elementen zusammen: den „family of repeats“ (FR) und dem „dyad symmetry“ Element (DS) [84]. Beide Elemente besitzen Bindestellen für das virale Protein „EBV-Nuclear-Antigen 1“ (EBNA1). Das FR-Element besteht aus 20 Wiederholungen einer 30 bp Sequenz, die wiederum ein 18 bp Palindrom für die EBNA1-Bindung enthält [84,85]. Das DS-Element ist das Replikationselement von OriP und enthält vier EBNA1-Bindestellen, das aus zwei Paaren von inversen Wiederholungen besteht [84,85] (Abb.1.3B). Dazwischen liegen drei Wiederholungen von Nonamer-Sequenzen, die zusammen mit dem DS-Element die Replikationseffizienz bestimmen [86,87].

Das virale Genom sowie OriP-enthaltende Plasmide replizieren nur einmal pro Zellzyklus [78,88]. Anhand von ChIP-Analysen an DS wurde gezeigt, dass der pre-

RC in gleicher Zusammensetzung wie bei zellulären pre-RCs gebildet und lizenziert wird [89-91]. Dies wurde zudem durch Experimente mit OriP-enthaltenden Plasmiden in Orc2- und Cdt1-defizienten Zellen bestätigt [90]. Somit stellt OriP ein sehr gutes Modell für die Untersuchung von Proteininteraktionen sowie für die Untersuchung der Mechanismen der Lizenzierung für zelluläre Origins dar.

Während im Plasmid-System das DS-Element essentiell und ausreichend für die Replikationsfunktion ist, initiiert die Replikation in EBV-Genomen überwiegend außerhalb von DS [92-95]. Alternative Initiationsstellen wurden vor allem in der EBV-positiven Zelllinie Raji am lytischen Replikationsursprung OriLyt entdeckt [96]. Auch Mutanten von EBV, in denen das DS-Element fehlt können eine EBV-Infektion in einer EBV-negativen Zelllinie auslösen. In diesem Fall wird eine Replikationsinitiationszone zwischen OriLyt und OriP beobachtet [97].

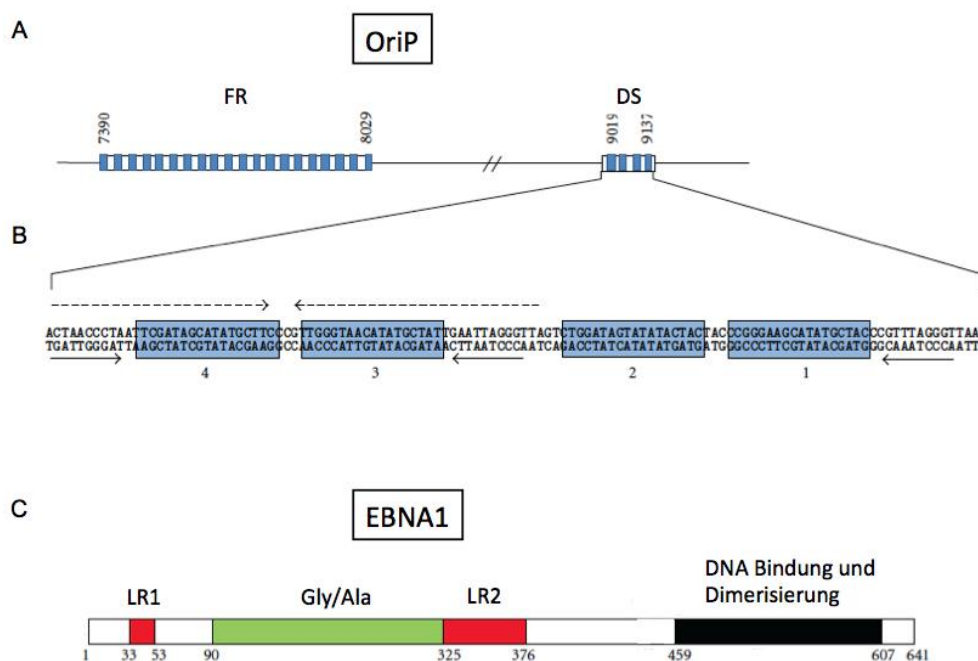


Abb. 1.3: Schematische Darstellung von OriP und EBNA1 Protein. (A) Sequenz von OriP und Anordnung von FR und DS mit ihren genomischen Koordinaten. Blaue Bereiche stellen EBNA1 Bindestellen in FR und DS dar. **(B)** Vergrößerung des DS-Lokus. Die blauen Boxen 1-4 stellen die Sequenzen für EBNA1 dar. Die zwei gestrichelten Pfeile kennzeichnen das „dyad symmetry“-Element. Die durchgehenden Pfeile stellen die Nonamer-Sequenzen dar. **(C)** Das EBNA1 Protein und seine funktionellen Elemente. Der N-Terminus setzt sich aus der Glyzin-Alanin-reichen Sequenz sowie den beiden „Linking“-Regionen zusammen. Der schwarze Bereich stellt die Domäne für DNA Bindung und Dimerisierung dar (Abbildung aus [98], modifiziert).

EBNA1 – der *trans*-Faktor für die EBV-Replikation

EBNA1 spielt für den Erhalt und die latente Replikation des viralen Genoms eine entscheidende Rolle [83,99]. Dieses Protein entfaltet seine Funktionen *in trans* mit OriP. Über FR verknüpft EBNA1 das virale Genom mit dem Wirtschromosom für den Erhalt des Virusgenoms im Zellkern [100-103]. Zusammen mit DS fungiert es als Replikator [93]. EBNA1 gliedert sich in zwei funktionelle Domänen (Abb. 1.3C): die C-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne und eine N-terminale Domäne. EBNA1 bindet als Dimer an OriP [85]. Der N-Terminus enthält einen Glyzin-Alanin-reichen Bereich, der keine Funktion für den Erhalt und die Replikation von EBV hat [99,104]. Wichtig für den Erhalt der viralen DNA und dessen Replikation hingegen sind die „Linking“-Regionen von EBNA1 im N-terminalen Bereich, die reich an den Aminosäuren Arginin (R) und Glyzin (G) sind [105-108]. Bei Bindung an FR ist die N-terminale Domäne für die Assoziation mit dem Wirtsgenom verantwortlich [100,106]. EBV nutzt den als „piggy-back“-bezeichneten Mechanismus für die Weitergabe des viralen Genoms auf die Tochterzellen in der Mitose [109-111]. Bei Bindung an DS hingegen, rekrutiert der N-Terminus für die Replikationsfunktion den hexameren ORC [91].

Eine Vermutung ist, dass EBNA1 das zelluläre Protein HMGA1a imitiert [112]. Dies ist auf eine Sequenzähnlichkeit der Proteine zurückzuführen. HMGA1a besitzt drei „AT-hook“ Motive, die bevorzugt AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA binden [113-115]. Durch den hohen Anteil an Arginin- und Glyzin- Aminosäuren ähneln LR1 und LR2 der „AT-hooks“ von HMGA1a und können ebenfalls AT-reiche Sequenzen *in vitro* binden [116]. Funktionell kann der N-terminale Bereich von EBNA1 mit der HMGA1a Sequenz mit Erhalt der Replikationsfunktion ersetzt werden [101,116]. Es wurde zudem gezeigt, dass die RG-reichen Motive von EBNA1 und HMGA1a jeweils die Interaktion zu ORC *in vitro* vermitteln, und dass die Interaktion RNA-abhängig ist [117]. Eine Annahme ist, dass HMGA1a durch die Bindung von AT-reichen Sequenzen, Replikationsursprünge im Heterochromatin definiert [74]. Eine Mutation der RG-Motive in HMGA1a und EBNA1 führt zu einem Verlust der RNA-Bindung, der ORC-Assoziation und der Replikations-funktion [117,118]. Für HMGA1a gestaltet sich die Untersuchung hinsichtlich der ORC-Chaperon Interaktion schwierig, da keine spezifische Origin-Sequenz bekannt ist, die von HMGA1a gebunden wird. Für die ORC-EBNA1 Interaktion ist die Analyse leichter, da der Replikationsursprung (DS) bekannt ist, an dem die Interaktion stattfindet.

EBER RNAs

Die EBER RNAs sind 167 bzw. 172 Nukleotide lang und liegen bis zu einer Kopienzahl von 10^6 im Zellkern vor [119-121]. Sehr wenig ist über die molekularen Mechanismen der EBER RNAs und deren Funktion für infizierte Zellen bekannt. In einigen Studien wird eine Krebs-fördernde Eigenschaft, wie Tumorentstehung und ein erhöhtes Transformationspotential bezgl. des Wachstums von infizierten B-Zellen beschrieben [122-124]. Andere Studien hingegen zeigen, dass EBERs nicht essentiell für die Primärinfektion, virale Replikation und B-Zell-Transformation sind [125-127].

Beide RNAs bilden ähnlich stabile „stem-loop“-Strukturen, die für Proteininteraktionen wichtig sind [119]. Zelluläre Interaktionspartner für die EBER RNAs stellen zum einen das Protein La und zusätzlich für EBER1 die Protein L22 und AUF1 dar [128,129]. Im viralen Kontext wurde in vitro gezeigt, dass EBNA1 an EBER1 bindet [130,131]. Die Funktionen der Protein-EBER1 Interaktionen sind bisher noch nicht geklärt.

Das OriP Plasmid-System

Die Selektion von Replikationsursprüngen in höheren Eukaryonten unterliegt unterschiedlicher Mechanismen. Um zu verstehen welche genetischen Faktoren die Origin-Selektion beeinflussen, ist ein System zur funktionellen Analyse von Origins von Vorteil, bei dem genetische Veränderungen für z.B. Mutationsanalysen leicht vorgenommen werden können. Krysan et al., (1989) entwickelten ein auf OriP-basierendes System, mit dem man humane Sequenzen auf Replikationsfähigkeit testen kann. Ähnlich wie für die Isolierung der autonom replizierenden Sequenzen in Hefen, wurden humane Sequenzen in ein bakterielles Plasmid mit Selektionsmarker eingefügt und auf autonome Replikation in humanen Zellen getestet [132,133]. Da humane Replikationsursprünge nicht automatisch den Erhalt des Plasmids in den Zellen garantieren, ist es wichtig ein Element für den extrachromosomalen Erhalt auf dem Plasmid zu haben [134]. Krysan et al., (1989) machten da von der OriP-Sequenz Gebrauch, da die funktionellen Elemente für Erhalt (FR) und Replikation (DS) innerhalb von OriP räumlich getrennt sind. Die Replikationsfunktion des Plasmids ist dann nur von EBNA1 und DS abhängig [92,93]. Die Substitution des DS-Elements mit humaner chromosomaler DNA konnte autonom replizierende

Sequenzen identifizieren, die unter Selektionsdruck über zwei Monate stabil erhalten bleiben [90]. Eine Tendenz zu einer gesteigerten Replikationseffizienz von großen gegenüber kleinen DNA Fragmenten konnte in einer weiteren Untersuchung von 62 zufällig ausgewählten humanen DNA Fragmenten festgestellt werden, die sich in ihrer Länge von 1 kb zu 21 kb unterschieden [132].

Das OriP Plasmid-System stellt ein sehr gutes Werkzeug für die funktionelle Untersuchung von Origins dar, da auch die genetische Modifizierung durch Klonierung einfach ist. Auf diese Weise lässt sich z.B. eine Korrelation der Replikationseffizienz mit Sequenz-Motiven durch Mutationsanalysen untersuchen. In dieser Doktorarbeit diene das OriP Plasmid-System dazu, ausgewählte Replikationsursprünge aus Maus hinsichtlich der Replikationseffizienz in Abhängigkeit von G-Quadruplex Strukturen zu untersuchen.

1.5. G-Quadruplex Strukturen

1.5.1. Definition

G-Quadruplex (G4-) Strukturen können sowohl in DNA- als auch in RNA-Sequenzen auftreten. Die G4-Struktur basiert auf einer Nukleotidsequenz, die reich an Guanin-Nukleotiden ist und eine viersträngige helikale Struktur ausbildet [135-137] (Abb. 1.4). Die Mindestanforderung für die Ausbildung einer G4-Struktur ist eine Sequenz die vier Bereiche (Cluster) mit jeweils mindestens zwei Guaninen besitzt ($G_{>2}N_xG_{>2}N_xG_{>2}N_xG_{>2}$). Stabil sind jedoch G4-Strukturen mit mindestens 3 Guaninen pro Cluster [138]. Die Anzahl der Nukleotide zwischen den G-reichen Bereichen kann variieren und unterschiedliche „Schleifen“-Strukturen (Loops) ausbilden [139-141]. Je kleiner die Anzahl der dazwischenliegenden Nukleotide ist, desto stabiler ist die G4-Struktur [138]. Die G-Nukleotide wechselwirken über Hoogsteen-Basenpaarungen zu planaren G-Tetraden [142]. Die Tetraden sind als Stapel angeordnet und werden über monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ stabilisiert [135,143,144] (Abb. 1.4A). Die G4-Strukturen sind thermisch stabiler als doppelsträngige DNA. Je nach Anordnung der G-Tetraden können sich parallele

oder antiparallele G4-Strukturen ausbilden (Abb. 1.4B). Außerdem sind sowohl intramolekulare sowie intermolekulare G4-Strukturen bekannt [139,145] (Abb. 1.4C).

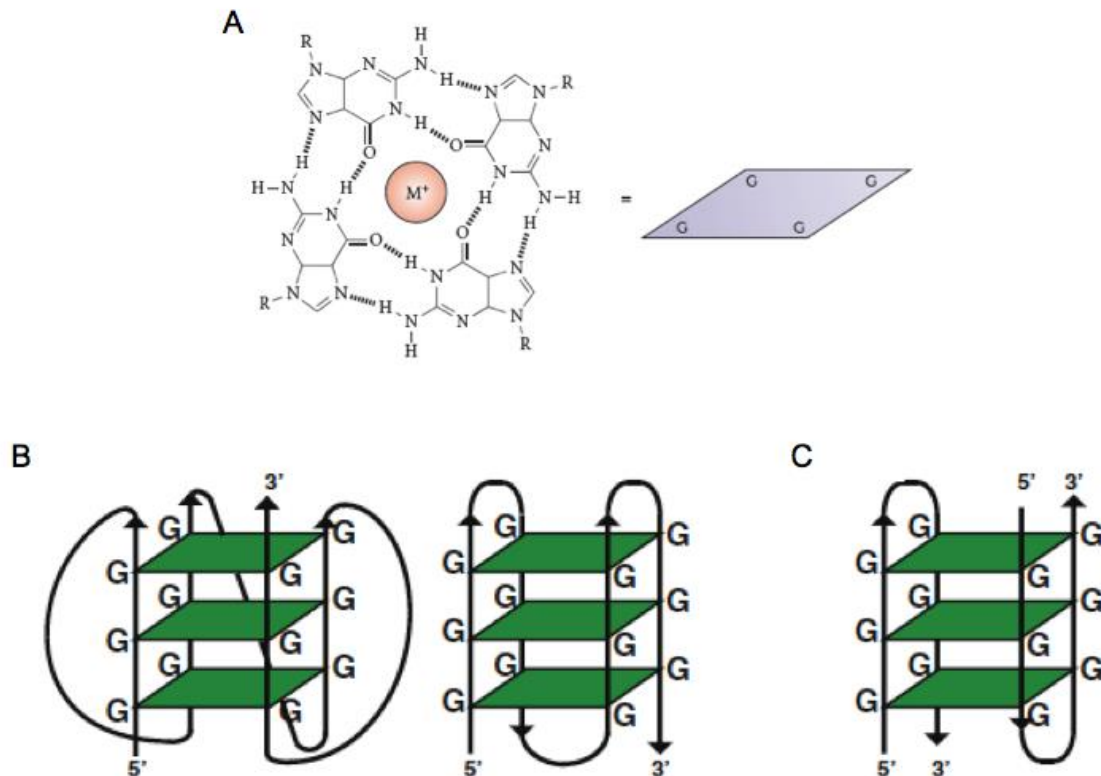


Abb. 1.4: G-Quadruplex Strukturen. (A) Darstellung der Hoogsteen-Basenpaarungen von vier Guanin-Nukleotiden, die eine planare G-Tetrade bilden (Abbildung aus [6]). Diese wird über ein monovalentes Kation stabilisiert (M^+). (B) Intramolekulare G4-Strukturen: Die G4-Struktur resultiert durch Anordnung der G-Tetraden. Die Anordnung kann parallel (links) bzw. antiparallel (rechts) erfolgen. (C) Intermolekulare G4-Struktur zwischen zwei Nukleotidsequenzen (Abbildungen B und C aus [142]).

Sowohl das Genom von Bakterien, wie die Genome von Hefe bis zum Menschen, sind reich an potentiellen G4-Sequenzen. Im menschlichen Genom wurden ca. 300.000 dieser G4-Motive detektiert [146,147].

Im Folgenden wird auf die Konsequenzen von G4-Strukturen im Genom und die Funktion dieser Strukturen auf zelluläre Prozesse näher eingegangen.

1.5.2. Konsequenzen von genomischen G4-Strukturen

Sowohl DNA Replikation als auch die Transkription bringen DNA in einen Spannungszustand. Das wird als „Supercoiling“-induzierter Stress bezeichnet [148]. Die Bildung von G4-Strukturen ist eine Möglichkeit diesen Stress zu kompensieren [149]. Aus *in vitro* Daten geht hervor, dass G4-Strukturen negatives „supercoiling“ ausgleichen [150]. Die thermodynamisch stabilen G4-Strukturen beeinflussen aber auch die DNA Replikation bzw. Transkription. Abhängig davon auf welchem Strang sich die G4-Struktur ausbildet, hat dies entweder aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die ablaufenden zellulären Prozesse. Auf der einen Seite wird für die Transkription bei Ausbildung einer G4-Struktur auf dem Matrizen-Strang eine Blockierung der Transkription postuliert (Abb. 1.5A) [6]. Auf der anderen Seite kann die Ausbildung auf dem kodierenden Strang den Ablauf der Transkription am Matrizen-Strang durch Einzelstrang-Bildung erleichtern (Abb. 1.5B) [6].

Eine G4-Struktur, die sich während der Replikation auf dem Leitstrang ausbildet, kann einen Replikationsarrest auslösen (Abb.: 1.5C) [151]. Zudem ist eine Ausbildung einer G4-Struktur auf dem als Einzelstrang vorliegenden Folgestrang ebenso begünstigt [151].

Auch G4-Strukturen in den Telomeren stellen ein Hindernis für die DNA Replikationsmaschinerie dar. In Säugerzellen zeichnet sich Telomer-DNA ein repetitives G-reiches Sequenzmotive aus, das aus dem in Tandem angeordneten Konsensus-Sequenz TTAGGG besteht. Der 3'-Strang liegt am Ende des Chromosoms als verlängerter Einzelstrang vor, der eine Ausbildung von G4-Strukturen auf diesem Strang begünstigt [140]. Bei der DNA Replikation können Chromosomenenden nicht vollständig repliziert werden, da für die Synthese des Folge-Strangs der Komplementär-Strang fehlt. Die Telomerase löst dieses Problem, indem sie die DNA, die komplementär zum 3'-Überhang ist, mit einer RNA-Matrize verlängert [152].

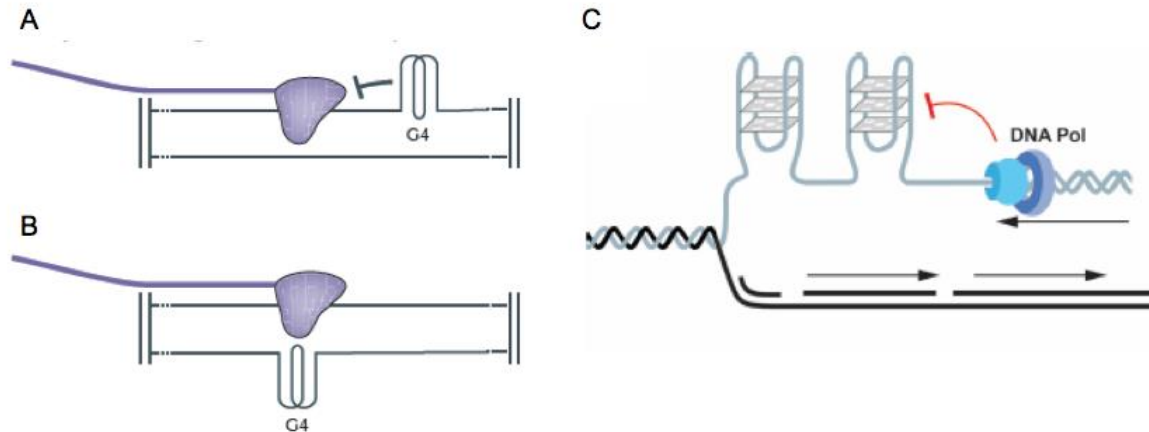


Abb. 1.5: Mögliche Konsequenzen von G4-Strukturen auf zelluläre Prozesse. (A) G4-Strukturen auf dem kodierenden Strang können die Prozessivität der Transkription blockieren. (B) G4-Strukturen auf dem nicht-Templat Strang können den Zugang von Proteinen zu Promotorregionen erleichtern. (C) G4-Strukturen können die Replikation blockieren (Abbildungen A und B aus [6], Abbildung C aus [151], modifiziert).

G4-Strukturen, die an Telomeren und während der DNA Replikation auftreten müssen aufgelöst werden, da sie ein Risiko für die Genomintegrität darstellen und spontane Chromosomen-Umordnungen auslösen können, die zur Tumorentstehung beitragen können [153,154]. Wichtige Proteine bei der Auflösung von G4-Strukturen sind Helikasen. Vor allem die Familie der ATP-abhängigen RecQ-Helikasen, spielt eine entscheidende Rolle. Ein Verlust der Aktivität dieser Proteine durch Mutation ist mit einem erhöhten Risiko der Tumorentstehung verbunden. Beispiele sind hier das Werner Syndrom oder das Blooms Syndrom, die aufgrund einer Mutation in den Helikasen WRN bzw. BLM zustande kommen [155,156]. Beiden Krankheitsbildern ist gemeinsam, dass in Patienten ein erhöhtes Krebsrisiko vorliegt. Beim Werner Syndrom leiden die Patienten zusätzlich an vorzeitigem Altern, das auf einen rasanten Verlust der Telomer-Sequenz zurückzuführen ist [157].

1.5.3. G4-Strukturen und zelluläre Prozesse

Um die Balance zwischen Funktion und Dysfunktion zu wahren bedarf es einer komplexen Regulation von G4-Strukturen auf molekularer Ebene. Hierfür ist ein komplexes Zusammenspiel aus Protein-Interaktion mit G4-Strukturen vonnöten.

G4-Strukturen sind nicht nur Folgeerscheinungen zellulärer Prozesse, sondern spielen auch bei der Regulierung dieser eine funktionelle Rolle. Im Folgenden wird diskutiert, welche zellulären Prozessen mit G4-Strukturen in eine funktionelle Verbindung gebracht werden. Dies wird anhand der Transkription und DNA Replikation näher erläutert. Aber auch in der Translation, epigenetischer Regulation, Meiose und Rekombination wird diesen Strukturen eine Rolle zugeschrieben [6].

1.5.3.1. G4-Strukturen und Transkription

Aus Genom-weiten bioinformatischen Analysen geht hervor, dass in einer Region, die ca. 1 kb stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle liegt, statistisch überproportional viele G4-Motive auftreten. Dies ist für ca. 50% aller humanen Gene der Fall [158]. Daraus wurde auf einen Zusammenhang zwischen G4-Strukturen und transkriptioneller Regulation geschlossen. Weitergehende Analysen zeigen, dass G4-Strukturen sehr häufig in Promotorregionen von Genen, die für regulative Proteine kodieren, wie z.B. Onkogene oder Transkriptionsfaktoren, vorhanden sind. Hingegen sind sie in Promotoren von „House-keeping“- und Tumor-Suppressor Genen eher unterrepräsentiert [158,159]. Dies weist darauf hin, dass G4-Strukturen Regulationsmechanismen für die Expression von bestimmten Genfamilien darstellen. Dabei ist es denkbar, dass G4-Strukturen von spezifischen G4-bindenden Proteinen erkannt werden, die weitere Proteine rekrutieren, die entweder eine stimulierende oder inhibierende Wirkung auf den Transkriptionsprozess haben. Das beste untersuchte Gen bzgl. einer Regulation durch G4-Strukturen ist das Onkogen *c-Myc*. Eine Überexpression von c-MYC führt zu einer erhöhten Zellproliferation und somit zur Krebsentstehung [160,161]. Die Promotor-Sequenz von *c-Myc* besitzt ein Nuklease-hypersensitives-Element (NHE), das sechs G-reiche Abschnitte enthält, die *in vitro* eine G4-Struktur bilden [162]. Dieses Element ist wichtig für die Promotorregulation. Eine Punktmutation in der G4-Sequenz führt zu einer erhöhten Genexpression, während eine Stabilisierung der G4-Strukturen mit dem G4-bindenden Molekül TmPyP4 zu einer Reduktion der Genaktivität führt [163,164].

1.5.3.2. G4-Strukturen und DNA Replikation

Genomische G4-Strukturen

Genomweite Sequenzanalysen zielen darauf ab, aktive Origins mit Struktur- und Sequenzeigenschaften der DNA sowie mit epigenetischen Faktoren und anderen zellulären Prozessen in Verbindung zu bringen. Vor allem die Suche nach genetischen Elementen, die Replikationsursprünge beeinflussen, wird durch die Möglichkeit der „High-Throughput“ Sequenzierung und bioinformatischer Analysen erleichtert.

Anhand genomweiter Daten von „Short-Nascent-Strand“ (SNS) Analysen in Maus, Drosophila und Mensch korrelieren aktive Origins mit G4-Motiven [11,12,165]. Die Studien zeigen, dass ca. 90% der Origins mit G4-Motiven assoziieren und G4-Strukturen korrelieren zudem mit einer hohen Origin-Dichte im Genom und einer frühen Replikation in der S-Phase [11]. Eine Korrelation von G4-Motiven mit aktiven Origins konnte in unterschiedlichen Zelllinien bestätigt werden [11].

Kennzeichnend für die Origins mit G4-Motiven ist, dass G4-Motive häufig in einem definierten Abstand zur Initiationsstelle (IS) lokalisiert sind. Diese liegt in Maus und Drosophila ca. 280 bp bzw. 160 bp strangaufwärts von der IS entfernt [165]. In humanen Zellen liegen G4-Motive ca. 250 bp strangaufwärts von der IS identifiziert [12]. Dies deutet darauf hin, dass die Replikationsinitiationsstellen durch die Gegenwart von G4-Motiven im Genom definiert werden können. Eine direkte Funktion dieser Motive für die DNA Replikation wurde in der Studie von Valton et al., (2014) anhand von Mutationsanalysen von Replikationsursprüngen aus der Hühnerzelllinie DT40 gezeigt. Die Autoren demonstrieren, dass G4-Strukturen einen Einfluss auf die Replikationseffizienz von Origins haben. Der Mechanismus, wie G4-Strukturen die Replikationsaktivität eines Origins beeinflussen ist noch nicht verstanden. Cayrou et al., (2015) zeigen dass die G4-Motive stromaufwärts zur IS mit einer Nukleosomen-freien Region korrelieren. Die Autoren postulieren, dass G4-Strukturen die Zugänglichkeit von Replikationsproteinen zu ihren Bindestellen gewährleisten und somit Origins markieren. Dieses Model wird durch eine Studie von Hoshina et al., (2013) bestätigt, in der in *in vitro* Analysen gezeigt wurde, dass ORC präferenziell G4-RNA und -ssDNA bindet. Somit ist es denkbar, dass ORC G4 DNA-Motive direkt erkennt, bindet und prä-Replikationsursprünge markiert. Ein Beweis dieser Hypothese ist bisher noch nicht erbracht worden. Die meisten Erkenntnisse

von G4-Strukturen im Hinblick auf DNA Replikation basieren auf bioinformatischen Korrelationsstudien. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine funktionelle Analyse von G4-enhaltenden Origins und eine Untersuchung im Hinblick auf eine Assoziation des pre-RC mit den G4-Motiven anhand des OriP Plasmid-Systems durchgeführt.

RNA G4-Strukturen

Eine Möglichkeit, wie ORC an seine Zielsequenzen bindet, ist über eine Interaktion von ORC mit ORC-Chaperonen. Im Kontext von EBV wurde gezeigt, dass die Interaktion von EBNA1 und ORC über RNA vermittelt wird [117]. Diese Interaktion kann mit Molekülen unterbunden werden, die spezifisch an G4-Strukturen binden. Die Studie von Norseen et al., (2009) untersuchte weiterhin den Einfluss von einem dieser Moleküle auf die EBV-Kopienzahl in EBV-positiven Zellen und auf die Replikation von OriP-Plasmiden [166]. Die Autoren postulieren, dass RNA G4-Motive essentiell für die EBNA1 ORC Interaktion sind.. Dabei wurde sowohl eine Abnahme der EBV-Kopienzahl sowie der Replikationsaktivität von OriP-Plasmiden beobachtet. Die Autoren erklären dies unter anderem mit einem inhibierenden Einfluss von dem G4-Liganden BRACO19 auf die RNA-abhängige ORC-EBNA1 Interaktion an OriP [166].

Bis heute ist nicht bekannt, welche spezifischen RNAs die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC vermitteln und inwiefern RNA G4-Motive die Replikation von EBV in infizierten Zellen beeinflussen.

Potentiell spezifische RNAs stellen die von EBV-exprimierten RNAs EBER1 und EBER2 dar. Diese wurden in einem ersten Versuch der RNA-Immunpräzipitation als Kandidaten für spezifische EBNA1-assoziierte RNAs identifiziert (Christoph Erik Mayer, AG Schepers, unveröffentlichte Daten). Ein Hinweis dafür ist, dass *in vitro* bereits gezeigt wurde, dass EBNA1 an EBER1 bindet [130,131]. Die Frage ist, ob EBER1&2 die Interaktion zwischen ORC und EBNA1 an DS vermitteln und ob, die G4-Motive daran beteiligt sind.

1.6. Zielsetzung

Die Selektion von Replikationsursprüngen ist in höheren eukaryontischen Zellen flexibel und noch nicht gut verstanden. Neben der DNA-Sequenz, -Struktur und chromosomalen Faktoren ist auch RNA als ein möglicher Faktor für die Origin-Selektion diskutiert. Ein Beispiel dafür ist die Erkennung des latenten Replikationsursprunges im Epstein-Barr Virus. Hier vermitteln nicht-kodierende RNAs die Interaktion von ORC mit dem viralen Chaperon EBNA1. Es ist noch nicht bekannt, ob spezifische RNAs die Interaktion vermitteln oder ob eine Gruppe an RNAs mit spezifischen Sequenz- und Strukturmotiven zusammengefasst werden kann.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die RNAs zu identifizieren und zu charakterisieren, die die ORC-EBNA1 Interaktion am viralen latenten Replikationsursprung OriP unterstützen. Die identifizierten RNAs sollten charakterisiert werden und auf spezifische Motive und strukturelle Eigenschaften untersucht werden. Zudem sollte die Fähigkeit der RNA(s) die Interaktion von EBNA1 mit ORC Proteinen zu vermitteln näher betrachtet werden. Dies sollte Einblicke über den Mechanismus geben, wie Replikationsursprünge in Eukaryonten über die ORC-Chaperon Interaktion in Zusammenhang mit RNA definiert werden.

Aus einer Studie geht hervor, dass die Interaktion von ORC zu EBNA1 von RNAs vermittelt wird, für die G4-quadruplex Strukturen hervorgesagt werden [166]. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, inwiefern RNA G4-Strukturen die Replikation des EBV-Genoms und die Ausbildung des pre-RC an OriP beeinflussen.

Bioinformatische Korrelationsstudien zeigen, dass G4-Strukturen im Genom von Säugerzellen mit aktiven Replikationsursprüngen assoziiert sind und dort die Origin-Aktivität beeinflussen. Der Mechanismus, wie G4-Strukturen die Origin-Effizienz modulieren ist noch nicht geklärt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb G4-Strukturen im Hinblick auf die Effizienz von Replikationsursprüngen zu untersuchen. Dies wurde funktionell anhand von Mutationsanalysen eines Maus Origins mit zwei G4-Motiven im OriP-Plasmid System analysiert. Letztendlich sollte geklärt werden, ob G4-Motive als Plattform für Proteine der Replikationsmaschinerie dienen.

2. Material

2.1. Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet®pro	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Axiovert 40 C/200M	Zeiss, Göttingen
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Biorupter UCD-200	Diagenode, Liège, Belgien
Electrophoreseeinheit	Hoefer Scientific Instruments, USA
Electrophoreseeinheit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsküvetten 1mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsgerät Gene pulser II	Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, USA
FACS calibur™	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage (< 120 g)	Bayrische Waagenwerkstätte, Utting a.A.
Film Kassetten	FujiFilm, Kleve
Geldokumentationsgerät	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelelektrophoresekkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
High-speed Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckman-Coulter, München
Illustra Microspin G-50 Säulen	GE Healthcare, München
Inkubator innova 4400	New Brunswick Scientific GmbH, Nüttingen
Inkubator Typ-B-5060-EK-CO	Heraeus, Hanau Deutschland
Light-Cycler™ qPCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührgerät RH basic	IKA Labortechnik, Staufen

Microcon Filter Gerät	Millipore, Darmstadt
Milli-RO 60 PLUS Wasserfilter Aquintus	Millipore, Darmstadt
NanoDrop® ND-1000 Spektrometer	ThermoScientific, USA
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
Optimax x-ray Film-Entwickler	Protec GmbH & Co KG, Oberstenfeld
PCR System 2400	Perkin Elmer, USA
Phosphoimager FLA 5100	Fuji Foto Film Co., Ltd., Japan
pH Meter	HANNA instruments, Mauritius
Pipetten	Gilson S. A. S., Frankreich
Powersupply	Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, USA; Consort, Belgien
Qubit™ Fluorometer	Invitrogen, Darmstadt
Robocycler 96	Stratagene, Heidelberg
„SemiDry“ Immunblot-System	Hoefer Scientific Instruments, USA
SevenEasy InLab413 pH-meter	Mettler Toledo, Gießen
Spektrometer DU 640	Beckmann, Heidelberg
Sterilwerkbank Lamin Air®, HBB 2448	Heraeus, Hanau
S220 Sonifiziergerät	Covaris, Brighton, England
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge klein	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer AccuBlock Digital DryBath	Labnet International Inc., USA
Thermostat	Grant, England
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage kern 470 (< 2000 g)	Kern, Albstadt
Wasserbad Acoline 100 Lauda	Dr.R.Wobser GMBH & Co KG
Wasserbad Haake D8	Thermo Haake, USA

Zentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen

2.2. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.2 aufgeführt

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
α - ³² P-UTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH, Deutschland
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Albumin, Rind	Sigma-Aldrich Chemie, München; Roche, Penzberg
Ampizillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich Chemie, München
ATX Poncau S red Färbelösung	Fluka Analytical, Steinheim
Borsäure	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
BSA, purified, 100x	New England Biolabs, Schwalbach
Butan/ Propan	Campingaz, Frankreich
Calciumchlorid	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
CTP	Sigma-Aldrich Chemie, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem GmbH, Darmstadt
DNA „loading dye“, 6x	New England Biolabs, Schwalbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München

Dimethylpimelinediimidatedihydrochloride (DMP)	Sigma-Aldrich Chemie, München
dNTPs	Roche, Penzberg
EGTA, Titriplex®	Merck Millipore, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethanolamin	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Fisch-Sperma	Thermo Fisher, USA
Fötale Kälberserum Lot.Nr. BS225160.5	Bio&Sell, Feucht
Formaldehyd, Methanol-frei	Thermo Fisher, USA
GeneRuler™ 1 kb/50 bp/Mix DNA Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gibco® DMEM Medium	Thermo Fisher, USA
Gibco® Glutamin (Zellkultur)	Thermo Fisher, USA
Gibco® Nicht-essentielle Aminosäuren (Zellkultur)	Thermo Fisher, USA
Gibco® Natriumpyruvat (Zellkultur)	Thermo Fisher, USA
Gibco® Penizillin/Streptomycin (Zellkultur)	Thermo Fisher, USA
Gibco® Optimem	Thermo Fisher, USA
Gibco® RPMI-1640 Medium	Thermo Fisher, USA
Glyzerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glyzin	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
G418/ Genetizin	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Thermo Fisher, USA
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Hygromyzin	PAA-Laboratories, Wien, Austria
Isoamylalkohol	Merck-Eurolab GmbH; Darmstadt

Isopropanol (2-Propanol)	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kaliumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lipofectamin 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Methanol	Merck-Eurolab GmbH; Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Natriumchlorid	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Natriumtetraborat	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
,N',N',N',N'-Tetramethylendiamine	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
<i>N</i> -Lauroylsarkosin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, München
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Orange G	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
PBS Dulbecco, pH 7.2	Biochrom AG, Berlin
Phenol	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Polyetylenimin (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, München
RNAse Zap	Sigma-Aldrich Chemie, München
Salzsäure	Merck-Eurolab GmbH; Darmstadt
Select Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie, München

TmPyP4	Merck Millipore, Darmstadt
<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton-X100	Sigma-Aldrich Chemie, München
tRNA	Roche, Penzberg
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher, USA
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

2.3. Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.3: Verwendete Materialien

AFA Fiber & Cap, Sonifiziergefäße	Covaris, Brighton, England
Amersham Hybond ECL	GE Healthcare, München
„Blotting“ Papier	Sartorius & Stedim GmbH, Göttingen
CEA x-ray screen (Immunblot)	Agfa Healthcare, Peißenberg
Cryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
Falcon® Einwegpipetten 1, 2, 5, 10 und 25 ml	Corning, USA
Falcon® Reaktionsgefäß 15 ml	Corning, USA
Filter Minisart® 0,22 µm, 0,45 µm	Sartorius & Stedim GmbH, Göttingen
FujiFilm Imaging plate	Fuji PhotoFilm Co., Ltd. Japan
GE High performance autoradiography	GE Healthcare, München
Handschuhe Nitril® Next Gen	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Mpulti® SafeSeal® Tubes	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Nalgene® Rapid Flow Filters	Thermo Fisher, USA

PCR Reaktionsgefäße, Klonierung	Perkin Elmer, Connecticut Thermo Fisher, USA
PCR 96-Loch Platten Framestar	4titude, England
Reaktionsgefäße 1 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Greiner Bio one, Frickenhausen
Pipettenspitzen Axygen™ mit Filter „low binding“	Corning, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Kisker Biotech, Mexiko
Pipettenspitzen standard, Diamond	Gilson S. A. S., Frankreich
Protein A/G Sepharose Kügelchen	GE Healthcare, München
Zellkulturflaschen CELLSTAR®	Greiner Bio one, Frickenhausen
Zellkulturschalen, 6-Loch Platten	Nunc GmbH, Wiesbaden

2.4. Kits

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgeführt.

Tab. 2.4: Verwendete Kits

CloneJET PCR Cloning Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
JETstar Maxi-prep kit	Genomed GmbH, Löhne
LightCycler® SYBR Green Master I	Roche, Penzberg
mMESSAGE mACHINE® T7 Transcription Kit	Ambion Thermo Fisher Scientific, USA
NucleoSpin Gel und PCR Clean-up kit	Macherey-Nagel, Düren
SuperScript® III First-Strand Synthesis	Thermo Fisher Scientific, USA

2.5. Enzyme/Proteine

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Proteine aufgelistet.

Tab. 2.5: Verwendete Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach
Bench Mark Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EBNA1 „wildtyp“ (Δ 95-319), rekombinant EBNA1 RGG-Mutante (Δ 95-319), rekombinant	Exprimiert und gereinigt von Arie Geerlof (Protein Purification Facility des Helholtz- Zentrums in Neuherberg)
HeLa Kernextrakt	Stock Biologicals
Poly-U Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Protease Inhibitor complete	Roche, Penzberg
Proteinase K	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Proteinase K	Fermentas, Thermo Scientific, USA
Pwo Polymerase	Peqlab, Erlangen
RNase, Dnase-free	Roche, Penzberg
RNase Inhibitor	Roche, Penzberg
RNase T1	Fermentas, Thermo Scientific, USA
Taq Polymerase	Exprimiert und gereinigt von C.-E. Mayer
T4 DNA Ligase	Affymetrix/usb products, UK

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs, Schwalbach und von Fermentas, Thermo Scientific, USA, bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

2.6. Plasmide

Übersicht der Plasmide, die in dieser Arbeit generiert und verwendet wurden. Die Nummer gibt die Identifikationsnummer der Plasmide bzgl. der AGV Datenbank an.

Plasmide für die *in vitro* Transkription

- 4875: pJet 1.2 – EBER1 (b 1-167) (C.-E. Mayer)
- 4877: pJet 1.2 – EBER1 (b 35-135) (C.-E. Mayer)
- 4878: pJet 1.2 – EBER1 (b 84-125) (C.-E. Mayer)
- 5450: pJet 1.2 – unstrukturierte RNA (Julia Damaschke)
- 6179: pJet 1.2 – EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut) (Julia Damaschke)
- 6180: pJet 1.2 – EBER1 (b 35-135, G4#2 mut) (Julia Damaschke)

Plasmide für Plasmid-Wiedergewinnungsversuche bzw. Chromatin-Immunpräzipitation

- 3230: OriP wildtyp mit Expressionskassetten für Hygromycin (SV40 Promotor) und destabilisiertem GFP (HCMV promoter) in pBluescript Plasmid-Hintergrund (Wolfgang Hammerschmidt)
- 3243: OriP delta DS Sequenz mit Expressionskassetten für Hygromycin (SV40 Promotor) und destabilisiertem GFP (HCMV promoter) in pBluescript Plasmid-Hintergrund (Jeaninne Gerhardt)

Folgende Plasmide wurden über Insertion der entsprechenden Sequenz in das 3243 Plasmid über *AscI* eingefügt (Phillippe Coulombe, Montpellier und Julia Damaschke, Helmholtz-Zentrum München):

- 5641: cMyc Sequenz
- 5645: cc2 1,9 kb Sequenz
- 5647: cc4 2 kb Sequenz
- 5649: cc2 500 bp Sequenz
- 5650: cc2 500 bp umgekehrte Sequenz
- 5651: cc4 500 bp Sequenz

5652: cc4 500 bp umgekehrte Sequenz
 5731: cc2 500 delta G4#1 Sequenz
 5734: cc2 330 bp Sequenz
 5737: cc2 500 G4#1 mut (1) Sequenz
 5738: cc2 330 bp umgekehrte Sequenz
 6175: cc2 500 bp G4#1 und G4#2 mut Sequenz
 6177: cc2 500 bp G4#2 mut Sequenz
 6191: cc2 500 bp delta G4#1 Dimer Sequenz
 6231: cc2 500 bp Tetramer Sequenz
 6232: cc2 500 delta G4#1 Tetramer Sequenz
 6243: cc2 500 Dimer Sequenz

2.7. Oligonukleotide

Tabellen 2.6 - 2.10 beinhalten Oligonukleotid- und Primer-Sequenzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Nummern vor den jeweiligen Sequenzen geben die Identifikationsnummer in der Primerliste der AG Schepers wieder.

Die Primer und Oligonukleotid-Sequenzen wurden anhand der Computersoftware Mac Vector 13.5.5 erstellt. Die Synthese wurde von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide für die RNA-Synthese

	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')
Unstrukturierte RNA	
239	AAAACATGCTTACTACCAGCTGGTACTTGACCGAAGACGGCA GAAAGCATATTTTGTGAATATAATCACAGACACCGTTCTCACC ACCCGG
240	AGGACATAAGCTGACATAAAGGTTTTGCTAGGGAGGAGACGT GTGTGGATATAGACAACCGTACCAGATACAAGTCCCGGGTGG TGAGAAC
EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut)	
369	AAACATGCGGACCACCAGCTGGTACTTGACCGAAGACGGCAG AAAGCAGAGTCTGGGAAGACAACCACAGACAGCGTACTCAGC ACACGGGA
370	AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGACGT

	GTGTGCCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGTGTGCTGAGTACGC
EBER1 (b 35-135, G4#2 mut)	
294	TAATACGACTCACTATAGGAGACGTGTGTGCCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGTGTGCT
295	GAAGACGGCAGAAAGCAGAGTCTGGGAAGACAACCACAGACAGCGTACTCAGCACACGGGACTTGTAC

Tab. 2.7: Verwendete Primer für die T7-PCR, die die T7-Promotorsequenz enthalten (fett gedruckt)

	Primer für PCR Sequenz (5' → 3')
EBER1 (b 1-167)	
174	AAAACATGCGGACCACCAGCTGGTAC
198	TCTTCTAGAAAGATTA TAATACGACTCACTATAG
EBER1 (b 35-135)	
197	TTTCAGCAAGATTA TAATACGACTCACTATAG
184	GAAGACGGCAGAAAGCAGAGTCTG
EBER1 (b 84-125)	
185	TAATACGACTCACTATAG AGGACGGTGTCTGTG
186	GAAGCAGAGTCTGGG
Unstrukturierte RNA	
241	TAATACGACTCACTATAG GAAAACATGCTTACTACCA
242	AGGACATAAGCTGACATAAA
EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut)	
173	TAATACGACTCACTATAAG GACAGCCGTTGCCCTAGTGG
174	AAAACATGCGGACCACCAGCTGGTAC
EBER1 (b 35-135, G4#2 mut)	
296	TAATACGACTCACTATAG GAGACGTGTGTGCC
297	GAAGACGGCAGAAAGCAGAGTCTG

Tab. 2.8 : Verwendete Primer für Klonierungen

	Sequenz (5' → 3')
490 BamHI fw 5649	AAAAGGATCCAAGGAAAACCCCGTGCAGGAAATG
491 BglII rev 5649	TTTTTAGATCTGGCGCGCCTGGGACAGTT
667 MluI fw	AAAAACGCGTCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGC
668 MluI rev	TTTTTACGCGTGGCAGCTGAGAATATTGTAGG

Tab. 2.9: Verwendete Primer für die quantitative PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	Experiment
575 DS 4.1 region short for	AGTTCACTGCCCCGCTCCT	ChIP-Analyse von cc2 500 ChIP Analyse in Raji-Zellen und LCLs
576 DS 4.1 region short rev	CAGGATTCCACGAGGGTAGT	
276 qPCR FR1_for	CGTGCTCTCAGCGACCTCG	ChIP-Analyse von cc2 500
277 qPCR FR1_back	TCAAACCACTTGCCCAACAAAAC	ChIP Analyse in Raji-Zellen und LCLs
375 cc2 500 G4_1 fw	CAACGACGAGGACCTGAC	ChIP-Analyse von cc2 500
376 cc2 500 G4_1 rev	TGCTCCATTTTTATTCTCTCTTGG	
377 cc2 500 G4_2 fw	GGACAAAGGGAAAATCCTCAAG	ChIP-Analyse von cc2 500
378 cc2 500 G4_2 rev	CCTATCCAGGGAAACCAGAC	ChIP-Analyse von cc2 500
364 qPCR OriLyt 5 for	CGTCTTACTGCCCAGCCTACT	ChIP Analyse in Raji-Zellen und LCLs
365 qPCR OriLyt 5 rev	AGTGGGAGGGCAGGAAAT	
362 qPCR qProm for	TGTCACCACCTCCCTGATAATGTC	
363 qPCR qProm rev	CATACACCGTGCGAAAAGAAGC	Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation
607 EBER1 intern fw	GCTGTAGCCACCCGTCCC	
608 EBER1	AAGCAGAGTCTGGGAAGACAAC	

intern rev		
190 EBER1 fw extern	AGGACCTACGCTGCCCTAGAG	
174 EBER1 rev extern	AAACATGCGGACCACCAGCTGGTA C	
609 RNU1 fw intern	CTTACCTGGCAGGGGAGATA	
610 RNU1 rev intern	GCAGTCGAGTTTCCCACATT	
541 RNU1 fw extern	ATACTTACCTGGCAGGGGAGATAC C	
542 RNU1 rev extern	CAGGGGAAAGCGCGAACG	
582 β -Actin for	CCAACCGCGAGAAGATGA	
583 β -Actin rev	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	
669 Unstrukturiert e RNA for	ACCAGCTGGTACTTGACCGAAGAC GGCAGAA	
670 Unstrukturiert e RNA rev	TGCTAGGGAGGAGACGTGTGTGG ATATAGACAACCG	
405 CytC for	CAATGCTCCGTTGTTGGCAG	Bestimmung der relativen EBV-Kopienzahl
406 CytC rev	CCTGGTGGGCGTGTGCTAC	

Tab. 2.10: Verwendete Oligonukleotide für den Primer Mix für die cDNA Synthese

163 24mer T	AGGAGCCATCGTATGTCGGGGGGGT
164 24mer A	AGGAGCCATCGTATGTCGGGGGGGA
165 24mer C	AGGAGCCATCGTATGTCGGGGGGGC

2.8. Bakterien

DH5 α :

F-; lacI-; recA1; endA1; hsdR17; (lacZYA-argF), U169, F80dlacZ M15; supE44; thi-1; gyrA96; relA1

Electromaxx DH10B (Invitrogen, Karlsruhe):

F-; mcrA; (mrr-hsdRMS-mcrBC), 80dlacZM15; lacX74; deoR; recA1; endA1; araD139; (ara, leu)7697; galU; galK; -; rpsL; nupG

2.9. Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.11 zusammengefasst. In Klammern sind die entsprechenden Nummern in der Zelllinien-Datenbank der Abteilung Genvektoren angegeben. Kursiv geschriebene Nummern beschreiben die Plasmidnummern in der Plasmid-Datenbank der Abteilung Genvektoren, die für die Generierung der Zelllinien verwendet wurden.

Tab. 2.11: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
HEK293 EBNA1: Humane Embryonale Nierenepithel-Zelllinie mit stabil integriertem EBNA1	Stefanie Fülöp (#1803) Stefanie Hermann (#2905)
Raji-Zellen: Burkitt-Lymphom Zellen	ATCC
EBER ⁺ -LCL und EBER ^{k.o.} -LCL: Lymphoblastoide Zellen generiert aus der Infektion von peripheren B-Zellen mit EBV-Mutanten (#2089 bzw. #4661)	Simon Jochum (#2655 bzw. #2656)

2.10. Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.11 zusammengefasst.

Tab. 2.12: Verwendete Antikörper

Spezifität	Ursprung	Verwendung	Verdünnung/Menge	Hersteller
EBNA1 1H4, IgG2a monoclonal	Ratte	ChIP/RIP	50 µl pro 50 µl Sephrose- Kügelchen	E. Kremmer, Helmholtz- München
		Immunblot	1:50	
IgG	Kaninchen	ChIP	2 µg pro 50 µl Sephrose- Kügelchen	Sigma
IgG	Ratte	ChIP/RIP	pro 50 µl Sephrose- Kügelchen	Sigma
Orc3 SA7976	Kaninchen	ChIP	15 µl pro 50 µl Sephrose- Kügelchen	Labor A.Schepers
		Kovalente Kopplung an Sephrose- Kügelchen	1:30	
Orc3 1D6	Ratte	Immunblot	1:50	E. Kremmer, Helmholtz- München
Mcm3 SA8413	Kaninchen	ChIP	15 µl pro 50 µl Sephrose- Kügelchen	Labor A.Schepers
Sekundär- Antikörper: α-Kaninchen-HRP α-Ratte-HRP	Ziege	Immunblot	1:10000	Jackson Immuno research Labs

3. Methoden

3.1. Zellbiologisches Arbeiten

3.1.1. Kultivierung von Zellen

EBNA1⁺-HEK293-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM mit 8 % fötales Kälberserum (FCS), 1 % Penizillin/Streptomycin und 220 ng/ml Neomycin (G418) kultiviert. Selektion wurde mit Hygromycin in einer Konzentration von 150 µg/ml durchgeführt. Raji-Zellen und lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-1640 Medium kultiviert, in dem 8 % FCS, 1 % Penizillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, und 1 % Pyruvat enthalten waren.

Adhärente Zellen

Das Vorgehen ist für eine 15 cm-Durchmesser-Platte mit ca. 80 % konfluenten Zellen beschrieben. Die Zellkulturschale wurde mit 10 ml 1 x PBS-Lösung versetzt und das PBS durch Schwenken verteilt. Danach wurde es entfernt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-Lösung bei RT für ca. 5 Min. behandelt. Nach dem Lösen der Zellen von der Oberfläche wurden 8 ml Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension resuspendiert. 1 ml der Suspension wurde zusammen mit 19 ml Medium auf eine neue Zellkulturplatte gegeben und gut gemischt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur gewünschten Konfluenz.

Suspensions-Zellen (Raji-Zellen, EBER⁺-LCL, EBER^{k.o.}-LCL)

Die Dichte der Zellen wurde anhand einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Suspensions-Zellen wurden bei einer Dichte zwischen 2×10^5 Zellen/ml und 8×10^5 Zellen/ml kultiviert. Das entsprechende Volumen an Zellen wurde aus der Zellsuspension entfernt, in eine neue Zellkulturflasche überführt und frisches Medium hinzugefügt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur gewünschten Konfluenz.

3.1.2. Einfrieren, Auftauen und Aufbewahrung von Zellen

5×10^6 wurden durch Zentrifugieren geerntet und das Pellet in 1 ml einer Lösung von 10 % DMSO in FCS resuspendiert. Die Zellen wurden in Nunc-Cryotubes® in einer Einfrierhilfe mit einem Isopropanolmantel auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Die Lagerung erfolgte dann in einem Flüssigstickstofftank. Zur erneuten Kultivierung wurden eingefrorene Zellen schnell bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad aufgetaut, in frischem Medium gewaschen und schließlich in frischen Medium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 kultiviert.

3.1.3. Transfektion von adhärenenten Zellen

Eine Zellkulturplatte mit konfluenten Zellen wurde wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben mit 1 x PBS und Trypsin behandelt. Nach dem Resuspendieren wurde die Zellzahl anhand einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 4×10^5 Zellen wurden pro Kammer einer 6-Loch-Platte gegeben und 2 ml frisches Medium wurde hinzugegeben. Die Zellen wurden durch Schwenken verteilt und für 24 Std. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

Für die Transfektion wurden pro 4×10^5 Zellen 2 μg DNA genommen. Einheitlichkeitshalber wurde die DNA vor der Transfektion auf eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in a. d. H_2O gebracht. Im Folgenden ist die Transfektion mit Lipofektamin und Polyetylenimin (PEI) beschrieben.

Lipofektamin 2000:

3 μl Lipofektamin wurden für 1 μg DNA verwendet. Pro Transfektion wurden 6 μl Lipofektamin zu 150 μl Optimem gegeben und die Lösung durchmischt. 2 μg DNA wurden in 150 μl Optimem gegeben und ebenfalls durch Pipettieren durchmischt. Danach wurde die Lipofektamin-Optimem-Lösung zur DNA-Optimem-Lösung hinzugefügt, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Je 290 μl der Lösung wurden tropfenweise zu je 4×10^5 ausgesäten Zellen der 6-Loch-Platte gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Transfektions-Lösung mit dem Medium der Zellen gemischt und anschließend 24 Std. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

PEI:

4 µl PEI wurden für 1 µg DNA verwendet. Pro Transfektion wurden 8 µl PEI zu 300 µl DMEM-Medium ohne FCS (FCS⁻-Medium) gegeben und die Lösung durch Pipettieren durchgemischt. 2 µg DNA wurden in 300 µl FCS⁻-Medium gegeben und ebenfalls durchgemischt. Danach wurde die PEI-FCS⁻-Medium-Lösung zur DNA-FCS⁻-Medium-Lösung hinzugefügt, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und für 20 Min. bei RT inkubiert. Vor der Transfektion wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 1 ml FCS⁻-Medium ersetzt. Je 590 µl der Transfektions-Lösung wurden tropfenweise zu je 4×10^5 ausgesäten Zellen pro Kammer einer 6-Loch-Platte gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Transfektions-Lösung mit dem FCS⁻-Medium der Zellen gemischt und anschließend 2-3 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium mit der Transfektions-Lösung von den Zellen entfernt und durch 2 ml FCS⁺-Medium ersetzt. Die Zellen wurden daraufhin 24 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Plasmid-Wiedergewinnungsversuche sowie für die Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente wurden die transfizierten Zellen nach 24 Std. Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ auf 15 cm-Durchmesser-Platten transferiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin-Lösung für ca. 5 Min. bei RT behandelt. Nach dem Lösen der Zellen von der Oberfläche wurden 2 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension resuspendiert.

Für die Kurzzeit-Experimente wurde das komplette Volumen der Suspension zusammen mit 17,5 ml Medium ohne Antibiotikum auf eine neue Zellkulturplatte gegeben und gut gemischt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂.

Für die Langzeit-Experimente wurde das komplette Volumen der Suspension zusammen mit 17,5 ml Selektions-Medium (mit 120 µg/ml Hygromyzin) auf eine neue Zellkulturplatte gegeben und gut gemischt. Danach erfolgte die Kultivierung der Zellen für 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.1.4. Vernetzen von Protein-DNA/RNA Interaktionen in Zellen (Crosslinken)

Protein-DNA/RNA Interaktionen wurden für Chromatin- und Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation (ChIP bzw. RIP) mit 1 % Formaldehyd kovalent verknüpft. Dazu wurden die Zellen in der Wachstumsphase geerntet und einmal in 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte das Zählen der Zellen mittels der Neubauer Zählkammer. Das Zellpellet wurde in dem Volumen 1 x PBS aufgenommen, sodass eine Endkonzentration von 2×10^7 Zellen erreicht wurde. Zum kovalenten Verbinden von DNA-Protein/RNA-Wechselwirkungen wurde eine 2 %ige Formaldehydlösung (in PBS) im selben Volumen wie die Zellsuspension hinzugegeben. Die Dauer des Crosslinks ist für jede verwendete Zelllinie für das entsprechende Experiment in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1.25 M Glyzin bei einer Endkonzentration von 125 mM gestoppt. Die Zellen wurden einmal in 1 x PBS gewaschen und anschließend in 0,5 % NP-40 in PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 10 % Glyzerin in PBS gewaschen, das trockene Pellet schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Tab. 3.1: Dauer des Crosslinks in entsprechenden Zelllinien

Zelllinie	Experiment	Dauer des Cross-links bei RT
Raji-Zellen und lymphoblastoide Zelllinien (EBER1 ⁺ -LCL, EBER1 ^{k.o.} -LCL)	RIP	10 Min.
	ChIP	7 Min.
EBNA1 ⁺ -HEK 293	ChIP	5 Min.

3.1.5. Bestimmung des Wachstums unter TmPyP4

Für die Wachstumskurven wurden die Zellen unter 5 μ M und 10 μ M TmPyP4 inkubiert und das Wachstum mit einer unbehandelten Kontrolle anhand der Bestimmung der Zellzahl nach 3 und 6 Tagen verglichen. Zunächst wurden die Suspensionszelllinien Raji, EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL mit einer Neubauer-

Zählkammer gezählt. Die Startkonzentration von Raji-Zellen und EBER⁺-LCL betrug 2×10^5 Zellen/ml, für EBER^{k.o.}-LCL 4×10^5 Zellen/ml in 5 ml Medium. (Die EBER^{k.o.}-LCL reagierte bei einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml mit einem Wachstumsstopp). Für Raji-Zellen und EBER⁺-LCL wurden 3×10^6 Zellen, für EBER^{k.o.}-LCL 6×10^6 Zellen bei RT, 1200 rpm für 7 Min. geerntet. Die einzelnen Zellpellets wurden mit je 3 ml unbehandeltem Medium resuspendiert.

Das Medium mit TmPyP4 wurde wie folgt vorbereitet. 2 sterile Reaktionsgefäße wurden jeweils mit 12 ml Medium abgefüllt. Zu einem Gefäß wurden 7,5 µl und zum anderen 15 µl einer 10 mM TmPyP4-Lösung in a.d. H₂O zugegeben. Dann wurden jeweils die 12 ml in je drei T25 Zellkulturflaschen à 4 ml verteilt. Für die Kontrolle wurden je 4 ml unbehandeltes Medium in drei T25 Flaschen gefüllt. Nun wurde pro Zelllinie je 1 ml der Zellsuspension auf Flaschen mit Medium ohne oder mit 5 µM, 10 µM verteilt und gemischt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach drei Tagen wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellsuspensionen auf 2×10^5 Zellen/ml bzw. 4×10^5 Zellen/ml und mit Medium auf das entsprechende Volumen eingestellt. Das entsprechende Volumen der 10 mM TmPyP4-Stammlösung für eine Endkonzentration von 5 bzw. 10 µM wurde nun direkt in die Zellkulturflaschen mit den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken gemischt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für weitere drei Tage inkubiert. Dann erfolgte erneut das Zählen der Zellen anhand der Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden anschließend für die FACS-Analyse und für Bestimmung der relativen EBV-Kopienzahl verwendet.

3.1.6. FACS-Analyse

Propidiumiodid-Lösung: 0,5 mg/ml in 1x PBS

Die Zellzyklusprofile wurden für Raji-Zellen, EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL bestimmt. Dazu wurden ca. 1×10^6 Zellen durch Zentrifugieren bei 1200 rpm für 5 Min., 4°C geerntet. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellpellets wurden in je 1 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden erneut bei 4 °C, 1200 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 1 ml eiskaltem 80 % Ethanol in 1 x PBS resuspendiert und für 30 Min. auf Eis oder bei -20 °C für 16 Std. fixiert bzw.

aufbewahrt. Danach wurden die Zellen bei 4 °C, 1200 rpm für 5 Min. zentrifugiert und die Pellets zweimal mit je 1 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Eine Zentrifugation bei 4 °C, 1200 rpm für 5 Min. wurde zwischen den Waschschritten durchgeführt. Anschließend wurden die Pellets in 500 µl eiskaltem 1 x PBS resuspendiert. Danach wurden je 100 µg RNase (20 mg/ml, Roche) hinzugegeben und auf Eis für 5 Min. inkubiert. Vor der Messung am FACS-Gerät wurden 50 µl Propidiumiodid-Lösung hinzugegeben und die Zellen kurz gevortext. 10000 Zellen wurden pro Analyse aufgenommen.

3.2. Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden, wie die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen, die Anfärbung von Nukleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid sowie die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgten in Anlehnung an Standard-Protokolle [167].

3.2.1. Bakterienkulturen

LB-Medium: 1 % NaCl, 1 %Trypton, 0,5 % Hefeextrakt

Agarplatten: 1 % NaCl, 1 %Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,5 % Selektagar

Selektion mit Ampizillin: 100 µg/ml

Escherichia Coli (*E. coli*) wurden in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) kultiviert. Nach Klonierung wuchsen transformante Bakterien als einzelne Kolonien auf Agarplatten mit Antibiotikum. LB-Medium wurde mit einzelnen Bakterienkolonien angeimpft. Die Zellen wurden unter Selektion ca. 16 Std., 200 rpm bei 37 °C inkubiert. Für die Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden die Bakterien in 30 % Glycerin gegeben und bei – 80 °C gelagert.

3.2.2. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

E. coli DH5 α wurden nach der Methode von Inoue chemisch kompetent gemacht [167]. Pro Transformation wurden 100 μ l eingefrorene Bakterien auf Eis aufgetaut und mit DNA vermischt. Nach 20 Min. Inkubation auf Eis, wurden die Zellen für 2 Min. bei 42 °C inkubiert und danach für 5 Min. auf Eis gestellt. 700 μ l LB-Medium wurden zu den Bakterien gegeben und 45 Min. bei ca. 750 rpm und 37 °C in einem Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Agarplatten mit Ampizillin-Selektion (100 μ g/ml) ausplattiert und für ca. 16 Std. bei 37 °C inkubiert.

3.2.3. Präparative Plasmidreinigung

200 ml LB-Medium mit entsprechender Selektion wurden mit einer Bakterienkultur versetzt und ca. 16 Std. bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Plasmidreinigung erfolgte mit Hilfe des „JetSTAR 2.0 Maxiprep Kit“ von Genomed nach Angaben des Herstellers.

Die Konzentrationsmessung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrometer.

3.2.4. Klonierung

3.2.4.1. Restriktionsverdau

Die Angaben der Herstellerfirma New England Biolabs (NEB) wurden für jedes Enzym hinsichtlich Konzentration, Puffer, Temperatur und Inaktivierungsbedingungen berücksichtigt.

Für Restriktionen wurden 4 μ l Plasmid-DNA von Plasmid-Minipräparationen verwendet.

Für Klonierungen wurden 2-5 μ g Plasmid-DNA in den Verdau eingesetzt.

Der Restriktionsverdau wurde, wenn nicht anders angegeben für 1 Std. bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt und danach gegebenenfalls hitzeinaktiviert. Danach wurden

die Reaktionsansätze in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert bzw. isoliert und mit dem NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel gereinigt.

3.2.4.2. Dephosphorylierung und Ligation

Um nach einem Verdau mit einem Enzym die Religation des Vektors zu verhindern wurde eine Dephosphorylierung des 5'-Endes mit alkalischer Phosphatase (CIP) nach Herstellerangaben (NEB) durchgeführt.

Bei der Ligation werden kompatible 5'- Phosphat mit 3'-OH-Enden von DNA-Strängen unter ATP-Verbrauch zusammengefügt. Folgende Kontrollreaktionen wurden bei der Ligation mitgeführt. Um die Religationsfähigkeit des Vektors zu überprüfen wurde eine Kontrolle ohne Insert durchgeführt. Um die Verdaueffizienz des Vektors nach Restriktionsverdau abzuschätzen wurde der Vektor ohne Insert und Ligase inkubiert.

Ligationsreaktionen wurden 2 Std. bei RT oder ca. 16 Std. bei 16 °C inkubiert. 100 µl chemisch kompetente Bakterien wurden mit 10 µl des Ansatzes transformiert (Kapitel 3.2.2).

Ansatz:

Vektor: 50 ng

Insert : 3-5 x molarer Überschuss zu Vektor

1,5 µl 10 x Reaktionspuffer

1 µl ATP (100 mM)

0,5 µl T4 DNA Ligase

Reaktionsvolumen 15 µl, aufgefüllt mit a.d. H₂O (Nuklease-frei)

3.2.4.3. Klonierung von cc2 500 bp G-Quadruplex Mutanten

Für die Generierung der Doppelmutante und der G4#2-Mutante der cc2 500 bp Sequenz (cc2 500 G4#1 und G4#2 mut bzw. cc2 500 G4#2 mut) wurden bei der Firma Genscript (Piscataway, USA) die jeweiligen Sequenzen mit *AscI*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende der Sequenz im pUC57 Plasmid bestellt. Eine Restriktion mit

AscI isolierte die 500 bp Fragmente aus den Plasmiden. Das 3243 Plasmid wurde mit *AscI* linearisiert. Anschließend erfolgte die Ligation der 500 bp Sequenzen in das 3243 Plasmid.

3.2.4.4. Multimerisierung von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 („Kopf-an-Schwanz Klonierung“)

Die im Rahmen der Multimerisierung durchgeführten PCRs erfolgten mit der Pwo-Polymerase unter Verwendung von 10 ng Plasmid und je 1 µl Primer (10 µM) und weiterer Zusammensetzung wie in Tabelle 3.2 aufgeführt. Das PCR-Programm wurde wie in Tabelle 3.3 bei entsprechender „Annealing“ Temperatur - ermittelt mit der Mac Vector 13.5.5 Software - durchgeführt.

Für die Multimerisierungen wurden zwei Primer synthetisiert, die sowohl die cc2 500 und die cc2 500 delta G4#1 Sequenz aus den Ausgangsplasmiden 5649 bzw. 5731 amplifizierten. Der Vorwärtsprimer enthielt die *BamHI* und der Rückwärtsprimer die *BglII* Schnittstelle (Tab. 2.8). Beide Enzyme bilden nach enzymatischer Spaltung einen kompatiblen 5'-GATC-Überhang.

Das jeweilige PCR-Produkt wurde über präparative Gelelektrophorese gereinigt und in einer „blunt-end“ Klonierung in pJet 1.2 Vektor nach Herstellerangaben eingefügt (= Vektor 1). Vektor 1 wurde zum einen mit den Enzymen *BamHI* und *BglII* verdaut, um das 500 bp Insert mit den kompatiblen 5'- und 3'-Enden über Gelelektrophorese zu isolieren.

Zum anderen wurde Vektor 1 mit *BamHI* linearisiert. Danach erfolgte die Ligation des isolierten 500 bp Inserts in den linearisierten Vektor 1. Mit den Enzymen *BamHI* und *BglII* wurde auf die gerichtete Orientierung der Dimer-Sequenz getestet (= Vektor 2). Bei den gerichteten Dimeren existieren diese beiden Schnittstellen nur an den Enden. Die potentiellen Schnittstellen in der Mitte des Dimers wurden durch Kombination der beiden Erkennungssequenzen zerstört.

Danach wurde die jeweilige gerichtete Dimer-Sequenz aus Vektor 2 mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern mit je einer *MluI*-Schnittstelle amplifiziert, gereinigt und in pJet 1.2 kloniert („blunt-end“ Klonierung) (Vektor 3).

Vektor 3 wurde dann mit *MluI* geschnitten, um die Dimer-Sequenzen zu isolieren.

Das Plasmid 3243 wurde mit *AscI* geschnitten. *MluI* und *AscI* generieren einen kompatiblen 5'-CGCG-Überhang. Die Dimer-Sequenzen wurden in 3243 ligiert und die Orientierung im Plasmid mit einem *BamHI*-Verdau überprüft.

Zur Generierung der Tetramer-Sequenzen wurde Vektor 3 zum einen mit *BamHI* und *BglII* geschnitten, das Insert (Dimer) isoliert und gereinigt. Zum anderen erfolgte ein Verdau mit *BamHI* zur Linearisierung des Vektors. Die Dimer-Sequenzen wurden in den Vektor eingefügt und mit den Enzymen *BamHI* und *BglII* hinsichtlich der Orientierung überprüft. Es resultierte jeweils Vektor 4 mit vier Sequenzen von cc2 500 bzw. cc2 500 delta G4#1, die mit einem *MluI*-Verdau isoliert und über die *AscI*-Schnittstelle in 3243 eingefügt wurden. Die Orientierung der Tetramer-Sequenzen in 3243 wurde mit einem *BamHI*-Verdau überprüft.

3.2.4.5. Klonierung von Oligonukleotiden in pJet 1.2 für die *in vitro* Transkription

Die jeweiligen Oligo-Sequenzen (Tab. 2.6) wurden im Robocycler mit der Pwo-Polymerase („proof-reading“ Aktivität und Generierung von „blunt-ends“) hybridisiert und amplifiziert. Hybridisierungs- und „Annealing“ Temperaturen wurden mit der Mac Vector 13.5.5 Software für Oligonukleotide und Primerpaare berechnet.

Zunächst wurde das Programm 1 mit dem Ansatz 1 durchgeführt (Tab. 3.2). Hier hybridisieren die überlappenden Bereiche der Oligo-Sequenzen. Mit dem Einbau von Nukleotiden über die Polymerase wird die doppelsträngige Sequenz generiert. Diese wurde anschließend mit dem Programm 2 und Ansatz 2 amplifiziert (Tab. 3.3). Die hier verwendeten Primer-Sequenzen enthielten die T7-Promotorsequenz und sind in Tabelle 2.7 wiedergegeben. Diese wurde für die *in vitro* Transkription benötigt.

3 µl des PCR-Produkts wurden nach Herstellerangaben in pJet 1.2 kloniert. Bei Bedarf wurde die T7-PCR mit 10 ng Plasmid und entsprechenden Primern durchgeführt.

Tab. 3.2: Hybrisierungsansatz mit entsprechendem Programm

Ansatz 1		Programm 1			
Oligo 1 10 µM	1 µl	Denaturierung (initial)	95 °C	2 Min.	1 x
Oligo 1 10 µM	1 µl	Denaturierung	95 °C	15 Sek.	1 x
dNTPs 10 µM	1 µl	Annealing	x °C	30 Sek.	1 x
MgSO ₄ 25 mM	4 µl	Elongation	68 °C	10 Sek.	1 x
10 x Puffer	5 µl	Elongation (final)	68°C	2 Min.	1 x
Pwo-Polymerase	1 µl	Abkühlen	4 °C	x	1 x
a.d. H ₂ O (Nuklease-frei) bis 48 µl	x µl		Temp.	Dauer	Zyklen

Tab. 3.3: PCR-Ansatz mit entsprechendem Programm (T7-PCR)

Ansatz 2		Programm 2			
Ansatz 1	48 µl	Denaturierung (initial)	95 °C	2 Min.	1 x
Primer 1 10 µM	1 µl	Denaturierung	95 °C	15 Sek.	30 x
Primer 2 10 µM	1 µl	Annealing	x °C	30 Sek.	
		Elongation	68 °C	15 Sek.	
		Elongation (final)	68°C	2 Min.	1 x
		Abkühlen	4 °C	x	1 x
			Temp.	Dauer	Zyklen

3.2.5. *In vitro* Transkription mit und ohne radioaktive Markierung

Als Matrize für die *in vitro* Transkription wurden bis zu 0,2 µg des PCR-Produkts verwendet. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben des mMACHINE mMESSAGE T7 Transcription Kits (Thermo Fisher) durchgeführt.

Bei radioaktiver Markierung der RNA erfolgte die Zugabe von α -³²P-UTP zum Schluss.

Die Reaktion wurde bei 37 °C im Thermoblock für 2 Std. inkubiert. Danach wurde 1 µl TurboTM DNase hinzugefügt und für weitere 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Um nicht-inkorporierte radioaktive Nukleotide zu entfernen wurde die RNA über Sephadex-G50 Säulen durch Zentrifugation gereinigt. Die Matrix der Säule wurde zunächst bei RT und 1200 rpm für 1 Min. zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein Eppendorf-Gefäß gestellt. Dann wurde die Reaktion auf die Matrix gegeben und erneut bei RT und 1200 rpm für 2 Min. zentrifugiert. Im Eppendorf-Gefäß war nun die RNA enthalten. Schließlich wurde die Konzentration der RNA mit dem Qubit-Messgerät nach Herstellerangaben bestimmt.

3.2.6. Bestimmung der relativen Kopienzahl des Epstein-Barr Virus Genoms in infizierten Zellen

1 x TE: 10 mM Tris pH 7,0; 5 µM EDTA

Proteinase K Puffer: 100 mM Tris pH8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl

Raji-Zellen, EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL wurden wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben mit TmPyP4 behandelt. Nach 6 Tagen wurde die Gesamt-DNA aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden 1 x 10⁶ Zellen bei 1200 rpm, 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl 1x TE Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 450 µl Proteinase K-Puffer hinzugegeben. Nach der Zugabe von 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) erfolgte die Inkubation der Zellsuspension bei 55 °C für 16 Std.. 3 µl RNase (20 mg/ml) wurden zugegeben und das Lysat für weitere 2 Std bei 37 °C inkubiert. Dann wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Gewinnung der Gesamt-DNA durchgeführt. Nach Zugabe des jeweiligen organischen Lösungsmittels wurde durch Invertieren des Eppendorfgefäßes die Phasen gemischt und jeweils für 5 min bei RT und 13200 rpm zentrifugiert. Bei allen Schritten wurde danach die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Reihenfolge und Volumenanteile der Lösungsmittel waren wie folgt:

1. 0,4 Vol. Phenol
2. 0,4 Vol. Chloroform

3. 0,8 Vol. Chloroform

Danach wurde die DNA durch Zugabe von 1/20 Vol. 3M Natriumacetat-Lösung und 0,7 Vol. Isopropanol gefällt. Die DNA wurde 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 µl 1 x TE Puffer vorsichtig resuspendiert.

Die EBV-Kopienzahl wurde mit quantitativer PCR bestimmt (Durchführung siehe Kapitel 3.2.7). Die Primer, die verwendet wurden sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Für die relative Quantifizierung der EBV-Kopienzahl wurde der „Advanced relative Quantification“-Modus von der LightCycler®-Software durchgeführt. Für jede Zelllinie wurde eine Standardkurve für jeweils das DS-Element von EBV als Ziel- und der Cytochrom C Locus als Referenz-Locus erstellt. Dies erlaubte eine präzise Berechnung der Konzentrationsverhältnisse von Ziel- zu Referenz-Locus unter Berücksichtigung der einzelnen PCR-Effizienzen. Das relative Verhältnis der Konzentrationen wurde über die Cp-Werte von Ziel- zu Referenz-Proben errechnet. Eine Normalisierung wurde mit einer Calibrator-Probe durchgeführt. Der Calibrator ist eine positive Vergleichsprobe mit einem stabilen Konzentrationsverhältnis von Ziel zu Referenz und dient dazu, Detektionsunterschiede innerhalb eines PCR-Laufs oder PCR-Läufe auf verschiedenen 96-Loch-Platten zu korrigieren. In diesem Fall wurden für den Calibrator 10 ng Gesamt-DNA aus Raji-Zellen als Replikat eingesetzt. Das Konzentrationsverhältnis des Calibrators wurde von der Software auf 1 gesetzt und die Werte von Ziel- zu Referenz-gen der Proben bezüglich des Calibrator-Wertes normalisiert.

3.2.7. Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Für die qPCR-Analyse wurde der LightCycler® SYBR Green Master I verwendet. Zunächst wurde von entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primern ein Mix vorbereitet. Dazu wurden jeweils 10 µl von der Primer-Stocklösung (100 µM) in 180 µl a.d. H₂O gegeben und durch Pipettieren vermischt. Somit erhielt man eine Konzentration von 5 µM für Vorwärts- und Rückwärts-Primer im Mix. Für die qPCR wurde von jedem Primerpaar ein Master-Mix vorbereitet.

Ansatz 1x Mastermix:

2,5 µl a.d. H₂O

5 µl 2 x SYBR-Green Mix

0,5 µl Primer-Mix (final 0,25 µM)

8 µl des Master-Mix wurden in die entsprechenden Kammern einer 96-Loch-Platte pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 2 µl Probe in die entsprechenden Löcher der Platte.

Die qPCR wurde im LightCycler® Gerät 480 von Roche Diagnostics mit dem Programm aus Tabelle 3.1 durchgeführt.

Tab. 3.1: Standardprogramm für die qPCR

Temperatur		Dauer in Sekunden	Zyklen
95 °C		10	1
95 °C		1	45
62 °C		10	
72 °C		10	
75 °C		3	
Schmelzkurve	97 °C	1	1
	67 °C	10	
	37 °C	15	1

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit der LightCycler® Software.

3.2.8. Der Plasmid-Wiedergewinnungsversuch

1 x TEN: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl

2 x HIRT: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 1,2 % SDS

HIRT-Extraktion

Zellkulturplatten mit einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % wurden für die HIRT-Lyse geerntet. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml 1 x PBS gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und 1,5 ml 1 x TEN Puffer vorsichtig auf die Zellen gleichmäßig verteilt. Danach wurden 1,5 ml 2 x HIRT Puffer vorsichtig und gleichmäßig hinzu pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurden die Zellen von der Platte gelöst. Mit einem Glasplättchen wurden restliche Zellen von

der Platte entfernt und das Zelllysate in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. Zum Fällen der Proteine wurden 750 µl 5M NaCl-Lösung auf das Zelllysate gegeben, das Röhrchen verschlossen und die Suspension durch vorsichtiges Invertieren des Röhrchens vermischt. Danach erfolgte die Inkubation bei 4 °C für mind. 16 Std..

Das Präzipitat wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 15000 rpm für 1 Std. vom Lysat abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die DNA über Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen.

Phenol-Chloroform-Extraktion

2 ml Phenol wurden zu dem Lysat gegeben und in einem Über-Kopf-Rotator 15 Min. inkubiert. Nach Zentrifugation für bei 4 °C, 15000 rpm für 30 Min., wurde die obere wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. 2 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) wurden hinzugefügt und erneut im Über-Kopf-Rotator 5 Min. inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm , für 15 Min. bei 4 °C wurde die obere wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. 2 ml Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) wurden hinzugefügt und erneut im Über-Kopf-Rotator 5 Min. inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C, 15000 rpm für 15 Min., wurde die obere wässrige Phase in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die DNA wurde nun durch Zugabe und Mischen von 0,1 Volumenanteilen Natrium-Acetat und 0,7 Volumenanteilen absolutem Isopropanol und Inkubation bei -20 °C für mind. 16 Std. gefällt. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugation bei 4 °C, 4000 rpm für 1 Std. erhalten. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 4 °C, 4000 rpm für 10 Min. wurde der Überstand verworfen, das Präzipitat an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl H₂O resuspendiert.

Verdau mit *DpnI*

Um die replizierte Plasmid-DNA anzureichern wurde ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. *DpnI* schneidet nur die methylierte Erkennungssequenz und somit die Plasmide, die für die Transfektion verwendet wurden. Für den Verdau wurden zu der in 100 µl H₂O resuspendierten Gesamt-DNA 11 µl Cut-Smart Puffer (NEB) hinzugegeben. 3 µl *DpnI* (20 U/µl) und 3 µl RNase (20 µg/µl, Roche) wurden hinzugefügt und der Verdau bei 37 °C im Wasserbad für 1,5 Std. inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe und Mischen von 20 µl 3 M Natrium-Acetat-Lösung und 400 µl 100 %

Ethanol und Inkubation bei -20 °C für mind. 16 Std. gefällt. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugation bei 4 °C, 13200 rpm für 20 Min. erhalten. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 4 °C, 4000 rpm für 10 Min. wurde der Überstand verworfen und erneut mit 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O resuspendiert.

Elektroporation von DH10B Bakterienzellen

Die Konzentration der DNA wurde mit dem Qubit-Messgerät nach den Herstellerangaben ermittelt. Für jede Probe wurden 300 ng DNA in 50 µl a.d. H₂O vorbereitet. Für die Kontrolle der Elektroporation wurden 50 µl a.d. H₂O als Negativ-Kontrolle und 100 pg PUC Plasmid (Invitrogen) in 50 µl H₂O als Positivkontrolle verwendet. 100 µl DH10B Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, 500 µl a.d. H₂O hinzugefügt und auf Eis vorsichtig resuspendiert. Je 100 µl der Bakteriensuspension wurden zu der DNA pipettiert, vorsichtig gemischt und in eine Elektroporationsküvette transferiert. Die Suspension wurde bei 25 µF, 200 Ohm und 2,5 kV elektroporiert. Danach wurde die Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml LB-Medium überführt und 1 Std. bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurden jeweils ein 10tel und neun 10tel der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Für ein 10tel wurden 100 µl der Bakteriensuspension ausplattiert. Für neun 10tel wurde die Suspension bei RT, 300 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl verworfen und das Bakterienpellet mit dem restlichen Medium resuspendiert und auf eine LB-Agar-Platte ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C für ca. 16 Std. erfolgte das manuelle Auszählen der Bakterienkolonien und die Bestimmung der Replikationseffizienz über das Verhältnis der Anzahl an Kolonien der einzelnen Probe zu einem Negativ-Referenzplasmid.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Kovalente Kopplung des Orc3 Antikörpers an Sepharose A Kügelchen (Beads)

Für den *in vitro* ORC „pull-down“ Versuch wurde der Kaninchen anti-Orc3 Antikörper an Sepharose A Beads gekoppelt. Zunächst wurden 500 µl einer 50 %igen Sepharose-A-Beads-Lösung dreimal mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Beads immer bei 4 °C und 1200 rpm für 2 Min. zentrifugiert. Danach wurden die Beads mit 150 µl Antikörper in 5 ml 1 x PBS bei 4 °C (Kühlraum) unter Rotation für 2 Std. inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Beads wurden zweimal mit 5 ml einer gesättigten Natrium-Borat-Lösung pH 9,0 gewaschen. Anschließend wurden 26 mg DMP zu 5 ml Natrium-Borat-Lösung pH 9,0 gegeben. Dieses Reagenz verknüpft Amin-Gruppen von Proteinen (und DNA) kovalent miteinander. Die Lösung wurde zu den Beads gegeben und es erfolgte eine Inkubation bei RT unter Rotation für 30 Min.. Danach wurden die Beads zweimal mit 5 ml einer 0,2 M Ethanolamin-Lösung pH 8 gewaschen und schließlich mit 5 ml dieser Lösung bei RT unter Rotation für 2 Std. inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die Kopplung durch im Überschuss zur Verfügung stehender Amin-Gruppen des Ethanolamins gestoppt. Danach wurden die Beads zweimal mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen und schließlich eine 50 %ige Lösung von gekoppelten Beads in 1 x PBS hergestellt. Die Beads wurden bei 4 °C gelagert und am folgenden Tag für den *in vitro* ORC „pull-down“ Versuch verwendet.

3.3.2. ORC „pull-down“

4 x Reaktionspuffer: 80 mM HEPES pH 7,6, 160 mM KCl, 0,4 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 20 % Glycerin, 1mM DTT

Reaktionspuffer: 1 x Reaktionspuffer + 6 U/ml RNase Inhibitor, 2 mg/ml BSA, 1 x Complete Protease Inhibitor

2 x Lämmli: 100 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS, 200 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau
HeLa Kernextrakt

rekombinantes EBNA1 „wildtyp“ Protein in 1 M NaCl-Lösung

Alle Komponenten und Proben wurden auf Eis aufgetaut und pipettiert. Unterstehend sind die Mengen- und Konzentrationsangaben für die einzelnen Komponenten pro Reaktion aufgeführt. In die Eppendorf-Gefäße wurde zunächst das entsprechende Volumen an Reaktionspuffer pipettiert und die einzelnen Komponenten danach hinzugegeben. Das rekombinante (rek). EBNA1 Protein und die *in vitro* transkribierte EBER1 wurden im äquimolaren Verhältnis in die Reaktion eingesetzt. Die Kontrollreaktion wurde ohne EBER1 durchgeführt und das fehlende Volumen mit Reaktionspuffer ersetzt.

pro Reaktion:

50 µl mit anti-OrC3 Antikörper gekoppelte Sepharose A Beads (50% ige Lösung)

50 µl HeLa Kernextrakt (entspricht ca. 200 µg)

1 µl rek. EBNA1 Protein (entspricht 4,69 pmol)

x µl *in vitro* transkribierte EBER1 (final: 4,69 pmol)

1 mM ATP

mit Reaktionspuffer aufgefüllt auf 200 µl

Die Reaktionen wurden bei 4 °C (Kühlraum) unter Rotation für 3 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Beads zweimal mit je 500 µl Reaktionspuffer gewaschen und zwischen den Waschschritten wurde bei 4 °C und 1200 rpm für 2 Min. zentrifugiert. Nach der Zugabe von 25 µl 2 x Lämmli-Puffer wurden die Proteine bei 95 °C im Thermoblock für 10 Min. von den Beads eluiert. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Analyse durch Immunblot gelagert.

3.3.3. Immunblot

1 x Laufpuffer: 192 mM Glyzin, 24 mM Tris pH 7,4; 3,4 mM SDS

2 x Sammelgel-Puffer: 0,25 M Tris pH 6,8; 7 mM SDS

5 x Trenngel-Puffer: 1,86 M Tris pH 8,8; 17 mM SDS

Immunblot-Puffer: 1 x Laufpuffer + 20 % Methanol

PBS-Tween (PBS-T): 1 x PBS, 0,1 % Tween-20

2,5 % und 5 % Block-Lösung: 2,5 g bzw. 5 g Milchpulver in 100 ml PBS-T

ECL-Lösung: Gebrauchslösung: 1 ml Lösung 1 und 3 µl Lösung 2

Lösung 1: 0,1 M Tris pH 8,8, 200 mM p-Cumarsäure, 1.25 mM Luminol

Lösung 2: 3 % H₂O₂

Für die Analyse über Immunblot wurden Proteine nach einem Standardprotokoll von Laemmli [168] in einem Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Danach wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran nach der Methode für den „semi dry“ Immunblot [169] unter Verwendung des Immunblot-Puffers transferiert (1 Std., 15V, 400 mA und 150 W). Die Membran wurde mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, um die Effizienz des Transfers zu bestimmen. Danach wurde die Membran für 30 Min. bei RT in Block-Lösung inkubiert, 3 x 5 Min. mit PBS-T gewaschen und mit dem Primärantikörper (verdünnt in PBS-T) für 1 Std. bei RT oder ca. 16 Std. bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde 3 x 5 Min. mit PBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in 2,5 % Milchpulver in PBS-T) 1 Std. bei RT versetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 Min. mit PBS-T erfolgte die Visualisierung der Proteine mit einer ECL-Lösung.

3.3.4. Elektromobility-Shift-Assay (EMSA)

4 x Reaktionspuffer: 80 mM HEPES pH 7,6, 160 mM KCl, 0,4 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 20 % Glyzerin, 1mM DTT

1 x Reaktionspuffer: 20 mM HEPES pH 7,6, 40 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 5 % Glyzerin, 0,25 mM DTT

1 x Reaktionspuffer „complete“: 1x Reaktionspuffer + 20 U/μl RNase Inhibitor, 2 μg/μl BSA , 100 ng tRNA

rekombinantes EBNA1 Protein in 1 M NaCl-Lösung

in vitro transkribierte RNAs markiert mit α-³²P-UTP: EBER1 (b 1-167), EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut), EBER1 (b 35-135), EBER1 (b 35-135, G4#2 mut)

Kompetitoren: unmarkierte *in vitro* transkribierte EBER1, tRNA (Roche)

6 x Ladebuffer: 40 % Glyzerin in 1x Reaktionspuffer

0,25 x TBE: 22 mM Tris, 22 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA

„Marker“: 0,2 % Bromphenolblau in 1 x Reaktionspuffer

Alle Komponenten und Proben wurden auf Eis aufgetaut und pipettiert. In die Eppendorf-Gefäße wurde zunächst das entsprechende Volumen an Reaktionspuffer und a.d.H₂O pipettiert und die einzelnen Komponenten danach hinzugegeben. Vom rekombinanten EBNA1 Protein wurden 0,64 pmol bzw. 1,2 pmol und von *in vitro*

transkribierten ^{32}P -RNAs 160 fmol in die Reaktionen eingesetzt. Zuletzt erfolgte die Zugabe an radioaktiv-markierter RNA. Die Proben wurden durch Schnippen des Gefäßes gemischt und kurz bei 4 °C, 3000 rpm für ca. 10 s zentrifugiert. Die Reaktionen wurden auf Eis für 15 Min. inkubiert. Danach wurden 4 µl 6 x Ladepuffer hinzugefügt und die Proben auf ein 5 %iges natives Polyacrylamid-Gel geladen. Das Gel wurde zuvor bei 4 °C (Kühlraum) und 35 V für ca. 30 Min. in 0,25 x TBE Puffer äquilibriert. Nach dem Laden des Gels lief dieses bei 4 °C und 35 V für ca. 16 Std. in 0,25 x TBE. Danach wurde das Gel auf einem Whatman-Papier bei 80 °C unter Vakuum für 1 Std. getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Gel in eine lichtundurchlässige Kassette zusammen mit einer „Imaging“ Platte oder einem Röntgenfilm gelegt und ca. 16 Std. inkubiert. Zuletzt erfolgte die Entwicklung anhand des FujiFilm FLA 5100 Gerätes bzw. anhand der Filmentwicklungsmaschine (Optimax).

3.3.5. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

LB3+ : 25 mM HEPES (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 x Protease Inhibitor complete, 0,5 % Sarcosyl, 0,1 % DOC, 0,7 % Triton X-100,

Block-Lösung: 5 % BSA, 0,003 % Fisch-Sperma, 1 x Protease Inhibitor complete, 0,1 % Triton X-100

RIPA-Puffer 150: 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC, 1 % NP-40, 1 mM EDTA

RIPA-Puffer 300: 50 mM Tris (pH 8,0), 300 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC, 1 % NP-40, 1 mM EDTA

LiCl-Puffer: 50 mM Tris (pH 8,0), 250 mM LiCl, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC, 1 % NP-40, 1 mM EDTA

TE: Tris-EDTA (pH 8,0)

Elutionspuffer: 1 x TE, 1 % SDS

Vorbereitung der Sepharose Kügelchen (Beads):

Beads: Protein A Sepharose, Protein G Sepharose

Protein A für die Benutzung von Kaninchen Antikörper, Protein G für Ratte oder Maus Antikörper

Beads für die Reduktion unspezifischer Beads-DNA Wechselwirkungen („Pre-clearing“-Beads): Je 50 µl Beads wurden pro ChIP vorbereitet. Die Beads wurden 3 x in 1 x PBS gewaschen und eine 50 %ige Lösung an Beads in PBS hergestellt.

Beads für die IP (ChIP-Beads): Je 50 µl Beads wurden pro ChIP vorbereitet. Die Beads wurden 3 x in 1x PBS gewaschen und mindestens 2 Std. bei 4 °C in Blocklösung inkubiert. Danach wurde eine 50 %ige Lösung an Beads in Blocklösung hergestellt.

Sonifizierung

Die gecrosslinkten Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in LB3+ Puffer so resuspendiert, dass eine Suspension von 2×10^7 Zellen/ml für EBNA1⁺-HEK 293 Zellen und eine 3×10^7 Zellen/ml für Raji-Zellen, EBER1⁺-LCL und EBER1^{k.o.}-LCL entstand.

Dann wurde jeweils 1 ml der Suspension in das Sonifiziergefäß überführt. Die Sonifizierung erfolgte in einem Covaris Sonifiziergerät (Covaris S220, Software: SonoLab 7.1) und folgende Einstellungen wurden für die jeweiligen Zelllinien verwendet:

Raji-Zellen und LCLs: 100 W, 150 „cycles/burst“, 10 „duty cycle“, 15 Min., 4-5 °C

EBNA1⁺-HEK 293: 100 W, 150 „cycles/burst“, 10 „duty cycle“, 10 Min., 4-5 °C

Danach wurde die Suspension für 15 Min. bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Bei mehreren Sonifizierschritten pro Zelllinie wurden die Überstände in einem 15 ml Reaktionsgefäß vereinigt.

ChIP

Das Chromatin wurde mit den „Pre-clearing“ Beads 1-2 Std. bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Nach Zentrifugation der Beads für 1 Min., 800 rpm und 4 °C wurde die Konzentration mit dem NanoDrop®-Spektrometer gemessen.

Für Raji-Zellen und EBER1⁺-LCL und EBER1^{k.o.}-LCL wurden 400-700 µg, für EBNA1⁺-HEK 293 100-200 µg Chromatin in einem Volumen von 500 µl (LB3⁺) pro ChIP eingesetzt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von spezifischen Antikörpern (Tabelle 2.11) für ca. 16 Std. bei 4 °C in einem Überkopfschüttler. Nach Zentrifugation für 10 Min., 13200 rpm und 4 °C wurde der Überstand in neue „low binding“ Reaktionsgefäße überführt.

Danach wurden pro ChIP 50 µl der ChIP-Beads hinzugefügt und 4 Std. bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert.

Die Beads wurden anschließend sequenziell einmal mit je 1 ml RIPA 150, RIPA 300, LiCl-Puffer und 2 x mit TE-Puffer gewaschen. Die Beads wurden während der Waschschriffe jeweils 2 Min. bei 1200 rpm und 22 °C im Thermostat geschüttelt und für 2 Min bei 1400 rpm und RT zentrifugiert. Protein-DNA Komplexe wurden in zwei Schritten mit je 100 µl TE 1 % SDS für 10 Min., 1400 rpm und 65 °C von den Beads eluiert. Danach wurde der Crosslink aufgehoben und die Proteine durch Proteinase K Verdau entfernt. Dazu wurden 8 µl Proteinase K (1 mg/ml) zu den Eluaten hinzugefügt und ca. 16 Std. bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 4 µl RNase (0,5 µg/µl) für 2 Std. bei 37 °C abgebaut. Die DNA wurde mit einem Nucleospin-Extrakt-II-Kit (Macherey-Nagel) gereinigt und in 40 µl Elutionspuffer gelöst. Die Analyse erfolgte in quantitativer PCR (Kapitel 3.2.7) mit Primerpaaren aus Tab. 2.9.

3.3.6. Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation (RIP) für die „High-Throughput“ Sequenzierung von RNAs

RNase-freies Wasser (DEPC-behandelt) wurde für die Pufferherstellung verwendet

RIPA 150: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 U/µl RNase Inhibitor

RIPA 500: 500 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 U/µl RNase Inhibitor

RNA Elutionspuffer: 1% SDS, 50 mM Tris pH 6.5, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 0.2 U/µl RNase Inhibitor

Zelllinien: Raji-Zellen und EBER1⁺-LCL und EBER1^{k.o.}-LCL, gecrosslinkt (Kapitel 3.1.4)

Vorbereitung der Sepharose Kügelchen (Beads):

Eine 50 %ige Sepharose-Beads-Suspension wurde dreimal in 1 x PBS gewaschen. Je 50 µl Beads-Suspension wurden mit 50 µl EBNA1 1H4 (monoklonal, Ratte) bzw. 2 µg IgG-Kontrollantikörper (Ratte) für 4 Std. bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach 2-fachem Waschen mit 1 x PBS wurde eine 50 %ige Beads-Suspension in 1 x PBS hergestellt.

Immunpräzipitation

Für eine Zelllinie wurde der doppelte Ansatz durchgeführt, um die Präparation hinsichtlich der Anreicherung der EBNA1-spezifischen RNA EBER1 mittels qPCR zu untersuchen.

Pro Zelllinie wurden je 1×10^7 gecrosslinkte Zellen für die EBNA1- und Kontroll-Immunpräzipitation (IgG), sowie für die Input Probe geerntet. Das Zellpellet wurde in 500 µl RIPA 150 resuspendiert und anschließend für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer für 15 Min. bei 4 °C, 13200 rpm vom Lysat abgetrennt. Das Zelllysat wurde mit dem Biorupter im Intervall von 30 Sek. 5 Min. sonifiziert. Anschließend wurden je 500 µl Lysat mit 4 U DNase (Turbo DNase, Ambion) verdaut und 15 Min. bei 4°C und 13200 rpm zentrifugiert. Für die Analyse im Immunblot wurden 20 µl Lysat als Input Probe genommen.

Pro Zelllinie wurden zu je 500 µl Lysat 40 µl EBNA1 1H4 bzw. IgG Antikörper-assoziierte Beads gegeben und über Nacht bei 4°C in einem Rotator inkubieren lassen.

Die Beads wurden bei 4°C, 1200 rpm. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für die Analyse im Immunblot wurden 20 µl vom Überstand Probe genommen.

Zur Reduktion der unspezifischen Bindung der RNA an die Beads/Antikörper wurde ein partieller RNase T1 Verdau nach der Immunpräzipitation durchgeführt. Zu den Reaktionen wurden 500 µl RIPA 150 mit 5 ng einer *in vitro*-transkribierten RNA (unstrukturierte RNA) und 2.5 U RNase T1 hinzugegeben. Zur Kontrolle des Verdaus wurde die RNA ohne RNase T1 hinzugefügt. Letzt genannte Proben dienten als Input für den RNase T1 Verdau. Der Verdau wurde bei RT und 2,5 Min. bzw. 5 Min. durchgeführt und die RNase anschließend mit 20 mM CaCl₂ inhibiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und für die weitere RNA Extraktion und cDNA Synthese weggefroren.

Die Beads wurden 2 x mit RIPA 500 gewaschen und zwischen den Waschschritten bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem 2. Waschen wurden 10 µl von der Beads-Suspension zur Kontrolle der EBNA1-Immunpräzipitation für den Immunblot genommen.

Zum Eluieren der RNA von den Beads und Aufheben des Crosslinks, wurden die Beads jeweils in 500 µl Elutionspuffer bei 70 °C für 45 Min. inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eine Phenol-Chloroform Aufreinigung durchgeführt.

Phenol-Chloroform Aufreinigung von RNA

Die Extraktion und Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi [170].

Demnach wurden zu 500 µl Eluat 50 µl 2 M Natriumacetat-Lösung pH 4.0 gegeben und kurz durchmischt. Nach Zugabe von Wasser-gesättigtem Phenol pH 4.5-5 im Verhältnis 1:1 und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (49:1) wurden die Phasen durchmischt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die vollständige Phasentrennung durch Zentrifugation für 20 Min, 13200 rpm bei 4 °C.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt und bei – 80 °C gelagert.

Die Proben wurden in Isopropanol zur „High Throughput“ Analyse zu Adam Grundhoff in Hamburg (Heinrich Pette Institut) gesendet.

Die Qualität der Präparation wurde anhand der Anreicherung der EBNA1-spezifischen RNA EBER1 bzgl. der IgG-Kontrolle in qPCR überprüft. Dazu wurden die präzipitierten RNAs in cDNA umgeschrieben.

cDNA Synthese zur Kontrolle der RIP-Präparation

Zunächst wurde die gefällte RNA 20 Min., 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 1 x mit 75 %igem und 1 x mit 100 %igem Ethanol gewaschen und schließlich an der Luft für 10 Min. getrocknet. Das Pellet wurde in 19 µl a.d. H₂O (DEPC) resuspendiert. Danach wurden mehrere Cytosin-Nukleotide an das 3'-Ende der RNAs mit der Poly(U) Polymerase für 1,5 Std. bei 37 °C angehängt. Das Enzym katalysiert nicht nur den Einbau von UTP, sondern von jedem Nukleotid, welches in der Reaktion vorliegt.

Reaktionsansatz:

19 µl isolierte RNA

2.5 µl 10 x NEB 2 Puffer

1,25 µl 10 mM CTP

1 µl Poly(U) Polymerase (2 U/µl)

1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)

Die RNA wurde wie oben beschrieben anhand einer Phenol-Chloroform Extraktion isoliert.

Der Poly-C Schwanz diente dann als Primertemplate für die cDNA-Synthese unter Verwendung des SuperScript® III First-Strand-Kits und 100 pmol/µl des Primer Mix aus Tabelle 2.10. Danach wurden die Proben 1/5 mit a. d. H₂O (DEPC) verdünnt und in quantitativer PCR mit spezifischen Primern analysiert (Tab. 2.9).

4. Ergebnisse

4.1. Die Rolle von RNAs und RNA G-Quadruplex Strukturen in der EBNA1-ORC Interaktion

Die Selektion von Replikationsursprüngen in höheren Eukaryonten ist sehr flexibel. Eine Möglichkeit wie ORC seine Zielsequenz bindet ist über Chromatin-Faktoren. Im Kontext von EBV stellt EBNA1 ein Interaktionspartner für ORC dar. EBNA1 vermittelt über seine N-terminale Domäne die Interaktion zu ORC am viralen Replikationsursprung OriP und leitet somit die Bildung des pre-RCs ein [89,91,117]. Die Interaktion erfolgt über die sogenannten „Linking“-Regionen 1 und 2 (LR1 und LR2) von EBNA1 [91,107]. LR1 und LR2 sind reich an Arginin (R) und Glyzin (G) Aminosäuren (AS), die das RGG-Motiv, ein bekanntes RNA-Bindungs-Motiv, aufbauen [171,172]. LR1 besitzt ein RGG-Motiv (AS 33-56), LR2 hingegen zwei RGG-Motive (AS 330-350 und 354-377). Diese Motive können gleichermaßen an RNA *in vitro* binden [131]. In einer Zusammenarbeit mit dem Labor von Paul Lieberman haben wir gezeigt, dass die Interaktion zwischen LR1 und LR2 von EBNA1 zu ORC RNA-abhängig ist [117].

Lu et al, (2004) demonstrierten, dass die RNA-Bindung von EBNA1 eher Sekundärstruktur- als Sequenz-abhängig verläuft. Außerdem konnte eine Präferenz für RNA, die reich an Guanin-Nukleotiden ist, beobachtet werden [130]. Diese Guanin-reichen Sequenzen können G-Quadruplex (G4-) Motive ausbilden. Das Lieberman-Labor untersuchte die G4-Abhängigkeit zwischen EBNA1 und ORC anhand von Immunpräzipitation in Anwesenheit von G4-bindenden Molekülen, die die Interaktion von ORC und EBNA1 *in vitro* inhibieren [166]. Die Hypothese war, dass diese Moleküle an die G4-Strukturen der RNA binden, die die Interaktion vermitteln, und ORC von EBNA1 verdrängen. Dieses Ergebnis deutet auf eine RNA-abhängige Interaktion zwischen EBNA1 und ORC hin, welche über G4-Motive verläuft.

Die funktionelle Relevanz potentieller G4-Strukturen für die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC und die Bildung des Prä-Replikationskomplexes (pre-RC) an DS wurde in dieser Arbeit in An- und Abwesenheit des G4-bindenden Moleküls TmPyP4

untersucht. TmPyP4 inhibiert die Telomeraseaktivität, induziert Apoptose und bewirkt einen Proliferationsarrest in Tumorzellen [173-176]. In Brustkrebszellen führt es zudem in Abhängigkeit der Konzentration zu einem Zellzyklusarrest in G2/M Phase [173]. TmPyP4 zeigt neben der inhibierenden Wirkung gegenüber Telomerase auch eine Reduktion der Expression der Onkogene c-Myc und k-Ras [164,177,178].

In der Literatur wurde bereits über eine Interaktion von EBNA1 mit der EBV-exprimierten RNA EBER1 in Electro-Mobility-Shift-Assays (EMSAs) berichtet [130,131]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu Beginn die Interaktion zwischen EBNA1 und EBER1 *in vitro* hinsichtlich der G4-Strukturen näher charakterisiert. Da wir mehr über die Bindungseigenschaften von EBNA1 zu EBER1 erfahren möchten, wurde die Interaktionsdomäne innerhalb der EBER1 Sequenz ermittelt. Um die Rolle der EBER1 für die EBNA1-ORC Interaktion zu analysieren, wurde ein *in vitro* ORC „pull-down“ Versuch etabliert. Im Anschluss wurde die funktionelle Relevanz der EBV-kodierten EBER RNAs für die EBV-Replikation *in vivo* untersucht.

Zuletzt wurde eine „High-Throughput“ Methode zur RNA-Immunpräzipitation etabliert, um zelluläre RNAs zu identifizieren, die die EBNA1-ORC Interaktion vermitteln können.

4.1.1. Einfluss von G4-Strukturen auf die EBV-Replikation in vivo

In diesem Kapitel wurde die Rekrutierung von ORC und des pre-RC an DS in Abhängigkeit von G4-Strukturen untersucht. Raji-Zellen sind Burkitt-Lymphomzellen, die eine hohe Kopienzahl von latent-persistierenden EBV-Genomen enthalten. Deshalb eigneten sie sich für die folgenden Analysen besonders gut. Für die Versuche wurde das G4-bindende Molekül TmPyP4 verwendet, das *in vitro* die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC unterbindet [166]. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung von Raji-Zellen, die mit TmPyP4 behandelt wurden, hinsichtlich Zellwachstum, Zellzyklus und EBV-Kopienzahl. Anhand von ChIP-Analysen wurde die Assoziation von den pre-RC Komponenten ORC und MCM2-7 an DS unter Einfluss von TmPyP4 untersucht.

Zellwachstum

Für die Analyse des Zellwachstums wurden Raji-Zellen an Tag 0 auf 2×10^5 Zellen/ml gesetzt und die Zellen mit 5 μM und 10 μM TmPyP4 für sechs Tage behandelt. An Tag 3 wurden die Zellen erneut auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Zellzahlen von behandelten und unbehandelten Raji-Zellen wurden nach drei und sechs Tagen ermittelt. Unbehandelte Zellen dienten als Referenz. Die Wachstumskurven sind in Abb. 4.1 dargestellt.

Innerhalb der ersten drei Tage wird eine ca. 4- bis 5-fache Steigerung der Zellzahl von unbehandelten und behandelten Zellen beobachtet. Zellen, die mit 5 μM und 10 μM TmPyP4 behandelt wurden zeigen somit keinen signifikanten Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zwischen Tag 3 und Tag 6 verdoppelt sich die Zellzahl von unbehandelten Raji-Zellen. Hingegen nimmt die Zellzahl von 5 μM und 10 μM behandelten Zellen von ca. 5×10^6 Zellen auf ca. 4×10^6 Zellen ab. Das Ergebnis zeigt, dass Raji-Zellen bzgl. ihres Zellwachstums sensitiv gegenüber einer Behandlung mit TmPyP4 sind. Möglicherweise wird bei einer Behandlung mit TmPyP4 in den Zellen Apoptose induziert, was auf einen Replikationsdefekt zurückgeführt werden könnte. Oder die Proliferation der Zellen ist durch einen Arrest des Zellzyklus inhibiert. Da TmPyP4 sowohl die Telomeraseaktivität als auch die Expression des Proliferationsfaktors c-MYC inhibiert, könnte die Stagnation des Wachstums auch auf diese Effekte zurückgeführt werden [163,173].

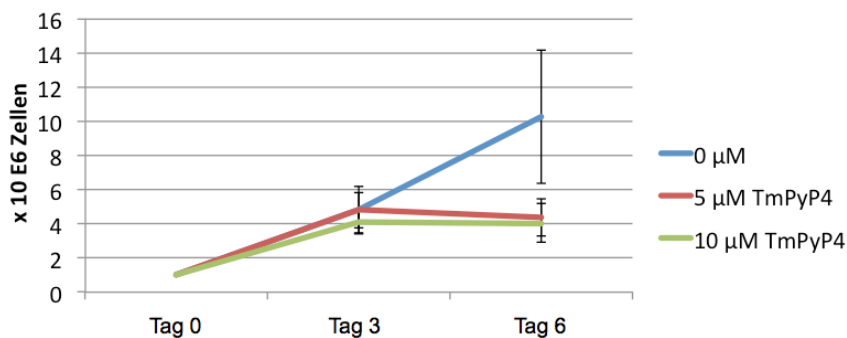


Abb. 4.1: Mit zunehmender Konzentration an TmPyP4 nimmt das Wachstum von Raji-Zellen ab. Zellwachstumskurven in Abhängigkeit von 5 μM und 10 μM TmPyP4. Gezeigt sind Mittelwerte ($n=4$) mit Standardabweichung. Die Zellen wurden unter den entsprechenden Konzentrationen TmPyP4 versetzt und nach drei bzw. sechs Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Wachstumskurven für Zellen unter 0 μM , 5 μM und 10 μM .

Zellzyklus-Analyse

Da im vorangegangenen Kapitel eine Abnahme der Anzahl von Raji-Zellen in Anwesenheit von TmPyP4 beobachtet wurde, sollte im Folgenden geklärt werden, ob diese Beobachtung auf eine Arretierung der Proliferation durch Zellzyklusarrest unter TmPyP4 zurückzuführen ist. Dafür wurden Raji-Zellen wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben sechs Tage mit 5 μM und 10 μM TmPyP4 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Referenz. An Tag 6 wurden ca. 1×10^6 Zellen für die FACS-Analyse geerntet und vorbereitet. Für die Visualisierung des DNA-Gehalts erfolgte die Zugabe des DNA-interkalierenden Agens Propidium-Iodid. 10.000 Zellen wurden gemäß ihrer Größe und Struktur durch Messung des Seitwärts- und Vorwärtsstreulichts (SSC, bzw. FSC) im FACS-Diagramm dargestellt (Abb. 4.2A, (1)). Ein einheitlicher Rahmen (Gate) wurde um die Haupt-Fraktion der Zellen gezogen, die für die Zellzyklusanalyse dienten. Aus dieser Zellpopulation wurde jeweils die Zellanzahl von der Software FlowJo ermittelt und in Prozent angegeben. Partikel mit geringer Streuung wurden als Zellfragmente definiert und nicht in die Analyse miteinbezogen. Die Mittelwerte der Anzahl an Zellen im Gate wurden anhand von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung berechnet (Abb. 4.2B). Die Zellzahl für behandelte und unbehandelte Raji-Zellen während der Behandlung mit 5 μM und 10 μM TmPyP4 nimmt nur sehr leicht von 95 % auf 94,5 % (5 μM TmPyP4) und auf 90,6 % (10 μM TmPyP4) ab (Abb. 4.12B). Eher ist in den FACS-Profilen die Tendenz zu beobachten, dass mit der Behandlung mit TmPyP4 die Fraktion an Zellen mit erhöhter Granularität zunimmt (Abb. 4.2A (1)). Dies könnte auf apoptotische Zellen hindeuten.

Für das Zellzyklusprofil wurde die Anzahl der Zellen im Gate gegen die Intensität der PI-Emission aufgetragen. Unbehandelte Raji-Zellen zeigen eine normale Verteilung von G1- und G2-Phase Zellen (Abb. 4.2A (2)). Der DNA-Gehalt steigt aufgrund der Proliferation in S-Phase und ist in G2 doppelt so groß wie in G1. Raji-Zellen, die mit 5 μM und 10 μM TmPyP4 für sechs Tage behandelt wurden, zeigen eine tendenzielle Abnahme der G1-Phase- und eine Zunahme an S-Phase Zellen. Dies deutet darauf hin, dass unter TmPyP4 die S-Phase verlangsamt ist. Dieser Effekt ist bei einer Behandlung mit 10 μM TmPyP4 besonders ausgeprägt. Aus der Literatur ist bekannt, dass TmPyP4 in Krebszelllinien Apoptose induziert [173-176]. Möglich ist, dass innerhalb der Zellfraktion im Gate die Anzahl apoptotischer Zellen mit der Behandlung mit TmPyP4 gestiegen ist. Um Einsicht über die prozentuale Anzahl an

apoptotischen Zellen zu erhalten, müsste an dieser Stelle eine simultane Annexin V und PI-Färbung in nicht-fixierten Zellen durchgeführt werden.

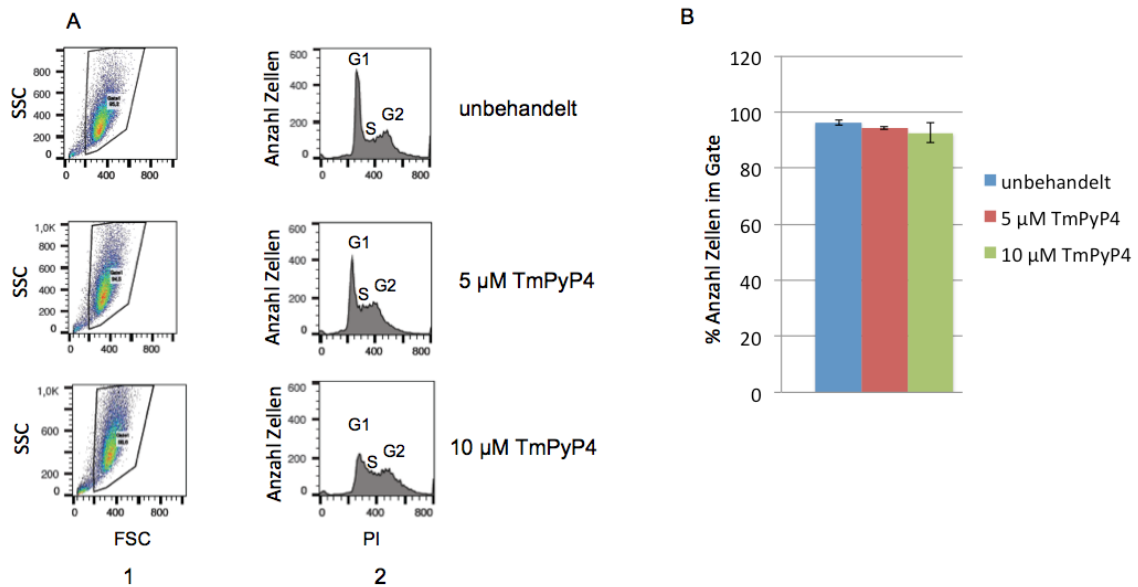


Abb. 4.2: Einfluss von TmPyP4 auf das Zellzyklusprofil und Zellebensfähigkeit von Raji-Zellen
FACS Analyse nach 6 Tagen Behandlung mit 5 μM bzw. 10 μM TmPyP4. Die Zellen wurden geerntet, fixiert und die DNA mit Propidium-Iodid markiert, um die einzelnen Zellzyklusphasen mittels FACS Analyse zu visualisieren. Exemplarisch ist ein Experiment gezeigt. **(A)** FACS Analyse von Raji Zellen. **(B)** % Anzahl der Zellen im Gate, ermittelt durch FACS Analyse. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Bestimmung der relativen EBV-Kopienzahl

Um die Rolle von G4-Strukturen in der EBV-Replikation zu untersuchen, wurde zunächst die relative EBV-Kopienzahl unter Einfluss von TmPyP4 bestimmt, indem das relative Verhältnis von einem chromosomalen Referenzlokus und einem EBV-spezifischen PCR-Produkt berechnet wurde.

Dafür wurden Raji-Zellen wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben sechs Tage mit 5 μM und 10 μM TmPyP4 behandelt. An Tag 6 wurde die Gesamt-DNA aus ca. 1×10^6 Zellen geerntet und über Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Spezifische Primer wurden für das DS-Element von EBV als Ziel- und für Cytochrom C als Referenzlokus verwendet. Cytochrom C diente als genomischer Lokus, der sich in den Zelllinien unter den gegebenen Bedingungen nicht verändern sollte. Für jede Zelllinie wurde eine Standardkurve für DS und Cytochrom C erstellt. Dadurch wurden die einzelnen Primer-Effizienzen in die Berechnung der Konzentrationsverhältnisse in den Proben von Ziel- zu Referenzlokus einberechnet. Das relative Verhältnis der Konzentrationen wurde über die Cp-Werte von Target- zu Referenz-Proben mit der Light-Cycler-Software errechnet. Eine Normalisierung wurde mit der Calibrator-Probe aus Raji-Zellen durchgeführt. Der Calibrator ist eine positive Vergleichsprobe mit

einem stabilen Konzentrationsverhältnis von Ziel- zu Referenzlokus und dient dazu, Detektionsunterschiede innerhalb eines PCR-Laufs oder verschiedener PCR-Läufe zu korrigieren. Die Normalisierung wurde mit einer Calibrator-Probe von 10 ng Gesamt-DNA aus unbehandelten Raji-Zellen durchgeführt.

In Abb. 4.3 sind die relativen EBV-Genom-Verhältnisse (DS/Cytochrom C) in Abhängigkeit von TmPyP4 und in Bezug zum Calibrator dargestellt. Da für Raji-Zellen die Calibrator-Probe gleich der unbehandelten Probe ist, sollte für diese Bedingung der Verhältniswert bei 1 liegen. Aufgrund experimenteller Schwankungen liegt der Wert bei 1,2. Mit Behandlung der Zellen mit 5 μ M und 10 μ M TmPyP4 wurde keine signifikante Änderung in der relativen Kopienzahl festgestellt. Die Kopienzahl bleibt auf dem Niveau der unbehandelten Zellen. TmPyP4 hat somit keinen Einfluss auf die relative EBV-Kopienzahl in Raji-Zellen und beeinträchtigt nicht die Replikation des EBV-Genoms.

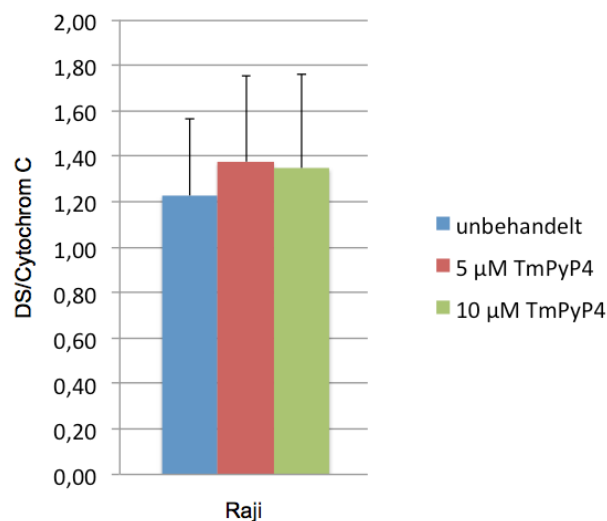


Abb. 4.3 : Die relative EBV-Kopienzahl in Raji-Zellen wird nicht durch TmPyP4 beeinflusst. Die EBV-Kopienzahl wurde nach drei Tagen Behandlung mit 5 μ M bzw. 10 μ M TmPyP4 bestimmt. Gesamt-DNA wurde aus den Zellen isoliert und das relative Verhältnis von EBV zur genomischen DNA mittels quantitativer PCR mit Primern für DS und Cytochrom C bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Die EBNA1-ORC Interaktion an DS

Im vorangegangenen Kapitel wurde die EBV-Kopienzahl in Raji-Zellen in Anwesenheit von TmPyP4 untersucht. Es wurde beobachtet, dass TmPyP4 keinen Einfluss auf die Replikation des EBV-Genoms hat. Es ist denkbar, dass durch die Behandlung mit TmPyP4 eine Stressantwort in den Zellen ausgelöst wird, die zur Aktivierung von „ruhenden“ Replikationsursprüngen führt, die unter normalen

Bedingungen nicht aktiv sind. In diesem Fall ist eine Änderung der EBV-Kopienzahl nicht feststellbar. Um zu untersuchen, welchen Einfluss TmPyP4 auf die EBNA1-ORC Interaktion und die Assemblierung des pre-RC an DS hat wurden Chromatin-Immunpräzipitation-Analysen (ChIP) durchgeführt.

Die Annahme ist, dass bei einer Inhibition der EBNA1-ORC Interaktion mit TmPyP4 ORC und MCM2-7 Proteine nicht mehr an DS assoziieren würden. Hingegen bliebe die EBNA1-Bindung an DS unbeeinflusst. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Assoziation von zwei Vertretern des ORC- und MCM2-7 Komplex, Orc2 und Mcm3, an DS in Abhängigkeit von TmPyP4 anhand von ChIP-Analysen untersucht. Da nach sechs Tagen mit TmPyP4 das Wachstum der Zellen inhibiert ist, wurden die Zellen an Tag 3 der Behandlung mit 10 μ M TmPyP4 geerntet und mit 1 % Formaldehyd behandelt. Bei diesem reversiblen Schritt werden Protein-DNA Bindungen kovalent verknüpft. Die Zellen wurden lysiert, sonifiziert und die ChIP mit spezifischen Antikörpern gegen Orc2 und Mcm3 und EBNA1 durchgeführt. Eine Kontrolle mit Präimmunserum (IgG-Kontrolle) wurde für die Bestimmung der Hintergrund-Bindung der Proteine an die Sepharose-Kügelchen bzw. Antikörper mitgeführt. Nach der Immunpräzipitation wurden die DNA-Fragmente, die an die Orc2 und Mcm3 Proteine gebunden waren, durch Proteinase K Verdau und Revertierung der kovalenten Bindung zwischen Protein und DNA isoliert. Nach dem RNase Verdau wurde die DNA über eine Silica-Membran (NukleoSpin[®]) gereinigt. Spezifische Primer-Paare (Tab. 2.9) wurden in der quantitativen PCR verwendet, um die Anreicherung von Orc2, Mcm3 und EBNA1 an DS zu bestimmen. Als Negativ-Lokus für Orc2 und Mcm3 dienten FR als virales Element und der lytische Replikationsursprung von EBV OriLyt. DS, FR und der Q-Promotor dienten hingegen als Positiv-Kontrolle und OriLyt als Negativ-Kontrolle für die EBNA1-Bindung. Die Anreicherung der einzelnen Proteine wurde in Bezug auf die IgG-Kontrolle berechnet und auf die Anreicherung am Negativ-Lokus OriLyt normalisiert (Abb. 4.4).

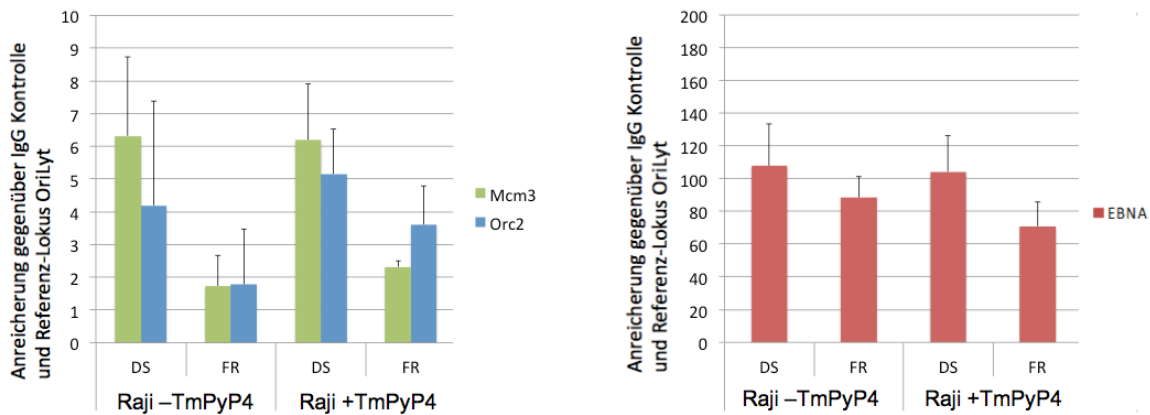


Abb. 4.4: ChIP-Analysen von Orc2, Mcm3 und EBNA1 Proteinen an DS in Abhängigkeit von TmPyP4. Die Zelllinie Raji wurde für 3 Tage mit 10 μ M TmPyP4 behandelt, mit 1 % Formaldehyd fixiert und der ChIP-Analyse unterzogen. TmPyP4-unbehandelte Zellen dienten als Referenz. Das Dyad-Symmetry-Element (DS) in unbehandelten Zellen stellt den Positiv-Referenzloкус für die Assoziation von Orc2, Mcm3 und EBNA1 dar. Gezeigt sind die Ergebnisse nach der Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Orc2 (blau), Mcm3 (grün) und EBNA1 (rot). Der lytische Replikationsursprung von EBV OriLyt dient als Negativ-Kontrollregion für Orc2 und Mcm3 und EBNA1. Das Family-of-Repeats Element (FR) stellt einen zusätzlichen Negativ-Lokus für Orc2 und Mcm3 dar. FR und der Q-Promotor dienen hingegen als Positiv-Loci für EBNA1. Die präzipitierte DNA wurde in der quantitativen PCR (qPCR) analysiert und die Anreicherung der spezifisch präzipitierten DNA relativ zu der aus der IgG Kontrolle dargestellt und auf die Anreicherung an OriLyt normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Für Mcm3 und Orc2 wurde eine ca. 4- bzw. 6-fache Anreicherung an DS in unbehandelten Raji Zellen beobachtet. Der Negativ-Lokus FR zeigt hingegen nur ca. 1,7-fache Anreicherung. Bei Behandlung der Zellen mit 10 μ M TmPyP4 verändert sich die Mcm3 und Orc2 Bindung an DS nicht signifikant.

Bzgl. der EBNA1-Anreicherung liegt das Niveau an DS und FR bei 110- bzw. 90-fach. Das Niveau ändert sich mit der Zugabe an TmPyP4 nicht signifikant. Auch die Assoziation von EBNA1 an den Q-Promotor veränderte sich bei Zugabe von TmPyP4 nicht. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl die ORC-Assoziation als auch die Bildung des pre-RC an DS unter TmPyP4 nicht beeinträchtigt ist.

Zusammengefasst hat TmPyP4 in einer Konzentration von 5 μ M und 10 μ M einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum von Raji-Zellen. Der Zellzyklus von behandelten Zellen und die EBV-Kopienzahl werden allerdings unter Einfluss von TmPyP4 nicht beeinträchtigt. Eine Inhibition der EBNA1-ORC Interaktion an DS konnte *in vivo* nicht bestätigt werden.

Aus den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten ergibt sich die Hypothese, dass die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC an DS möglicherweise nicht über G4

RNAs vermittelt wird oder, dass diese G4 RNAs *in vivo* keine Zielstrukturen für TmPyP4 darstellen.

4.1.2. Charakterisierung der EBNA1-EBER1-ORC Interaktion

4.1.2.1. EBER1-Konstrukte für die Untersuchung der EBNA1-EBER1 Interaktion *in vitro*

Es ist möglich, dass die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC über spezifische RNAs G4-unabhängig verläuft. Daher wurden Versuche zur Identifizierung von EBNA1-spezifischen RNAs durchgeführt. Dafür wurde eine erste Ribonucleoprotein-Immunpräzipitation (RIP) an EBNA1 in EBV-positiven Raji-Zellen durchgeführt (Christoph-Erik Mayer, AG Schepers, unveröffentlichte Daten).

Ein Abgleich der isolierten und sequenzierten RNAs mit dem EBV-Genom ergab, dass die von EBV-exprimierten RNAs EBER1&2 mit EBNA1 assoziieren. Weitere EBV-codierte RNAs wurden nicht identifiziert. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die EBERs die häufigsten RNAs EBV-infizierter Zellen sind [119-121].

Dieses vorläufige Ergebnis stand im Einklang mit den bereits veröffentlichten *in vitro* Studien von Snudden et al., (1994) und Lu et al., (2004), die in EMSAs zeigten, dass EBNA1 über seine RGG-Motive an EBER1 bindet. Lu et al., (2004) bestätigten ebenfalls qualitativ die EBNA1-EBER1 Interaktion *in vivo* anhand von RIP-Versuchen. Es ist noch nicht bekannt, welche Sequenz-Motive von EBER1 für die EBNA1-EBER1 Interaktion notwendig sind. Um die Kernsequenz zu ermitteln, wurde ein partieller RNase T1 Verdau des EBNA1-EBER1-Komplex *in vitro* durchgeführt und die EBNA1-protectierte EBER1-Fragmente sequenziert. Hieraus wurden folgende EBER1-Sequenzen als potentielle Interaktionsdomänen erhalten. EBER1 (b 35-135), und EBER1 (b 84-125) mit 100 b bzw. 41 b Länge (Christoph-Erik Mayer, AG Schepers, nicht veröffentlichte Daten) (Abb. 1A /B b und c).

Die Interaktion von EBNA1 mit den einzelnen EBER1-Fragmenten wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von Electro-Mobility-Shift-Assays (EMSAs) untersucht. Da in der Literatur berichtet wird, dass EBNA1 bevorzugt an hochstrukturierte Sequenzen und G4-Strukturen in der RNA bindet, wurde die Interaktion zudem in Abhängigkeit der Struktur und der G4-Motive analysiert [130,166].

Die gesamte Länge der EBER1-Sequenz wird im Folgenden mit EBER1 (b 1-167) bezeichnet. Für weitere Längen-Mutanten wird die Basenposition bzgl. der Volllängen-EBER1 in Klammern gekennzeichnet.

In Abb. 4.5A. sind die Sequenzen der RNAs zusammengefasst, die auf Bindung zu EBNA1 im EMSA untersucht wurden. Zusätzlich ist jeweils die thermodynamisch stabilste Sekundärstruktur dargestellt, die mit „The Vienna RNA Websuite“ ermittelt wurde [179,180] (Abb. 4.5B). Über die Farbkodierung wird angegeben, wie hoch die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarungen innerhalb der Struktur bzw. für einzelsträngige RNA-Abschnitte ist. G4-Strukturen werden mit der Software allerdings nicht berücksichtigt.

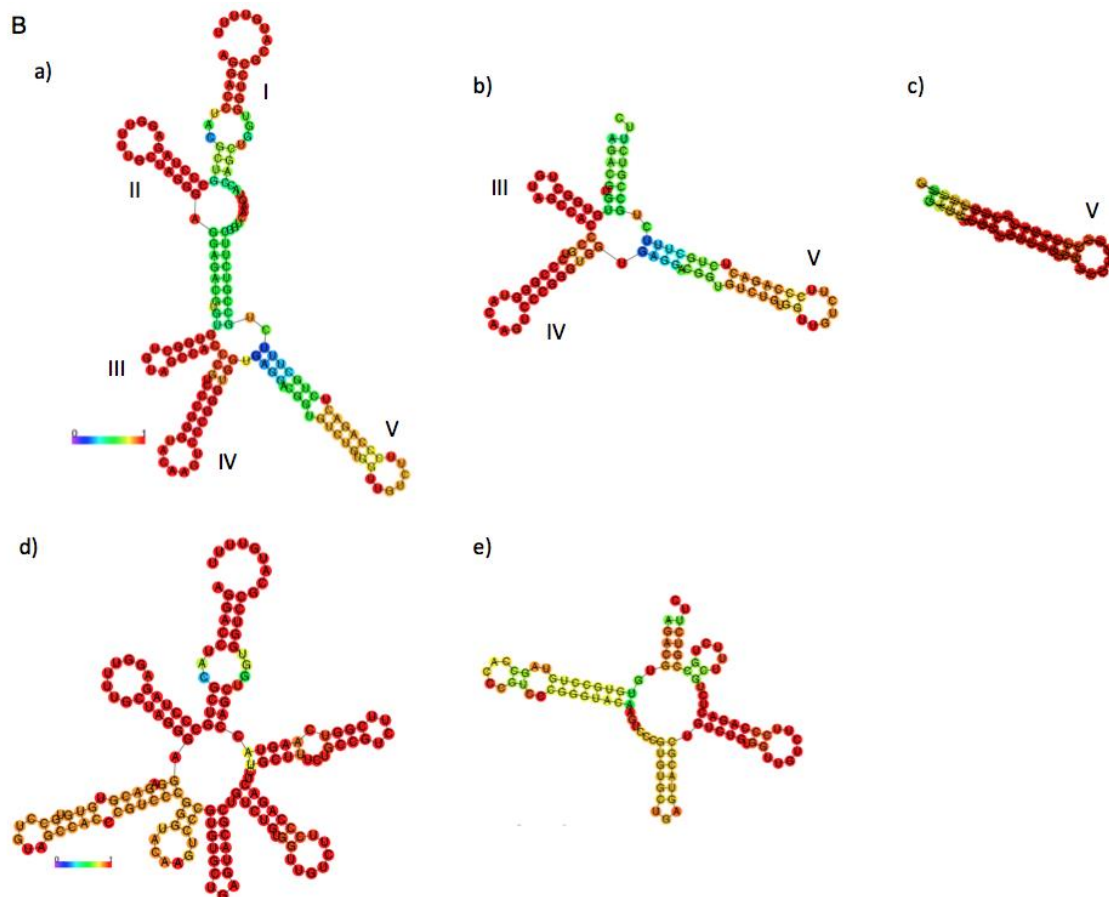
Um potentielle G4-Motive in EBER1 zu identifizieren, wurde die „QGRS-Mapper“ Software verwendet [181]. Die EBER1-Sequenz enthält zwei G4-Motive mit G-scores von 28 und 35 für G4#1 und G4#2 (Abb. 4.5A a). Der G-score ist ein Maß dafür, wie wahrscheinlich die G4-Motive G4-Strukturen ausbilden können. Für die Berechnung des G-scores wird die Anzahl der einzelnen G-Tetraden, sowie die Länge der Nukleotide ("Loops") zwischen den einzelnen G-Tetraden berücksichtigt. Hierbei gilt, je kürzer die Loops, je höher die Anzahl an Tetraden und ähnlicher die Länge der Loops, desto höher der G-score und desto wahrscheinlicher ist es, dass das G4-Motiv eine G4-Struktur ausbildet. Der höchste G-score wurde von der „QGRS Mapper“ Software mit 105 angegeben. Typische G-scores haben einen Wert zwischen 12 und 42 [68,166,182].

Basierend auf der QGRS-Analyse wurden EBER1 Varianten kloniert, die Mutationen in den G4-Motiven tragen. Eine Doppelmutante von EBER1, EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut), wurde generiert, in der beide G4-Motive durch 2 bzw. 4 Basenänderungen aufgehoben wurden. Das zweite G4-Motiv wurde ebenfalls in der 100 bp Sequenz von EBER1 durch die gleiche Punktmutation aufgehoben (EBER1 (b 35-135, G4#2 mut)). Da EBNA1 bevorzugt an Sekundärstruktur-reichen RNAs bindet wurde eine RNA als Negativkontrolle synthetisiert, die 167 b lang ist, keine G4-Motive enthält und arm an Sekundärstruktur-Elementen ist. Diese RNA wird im Folgenden als unstrukturierte RNA bezeichnet.

A

RNA	Sequenz	G4 Motive/ G score
a) EBER1 (b 1- 167)	AGGACCTACGCTGCCCTAGA GGTTTTGCTAGGGAGGAGACGTGTGTGG CTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCC GGGTGGTGAGGACGG TGT CTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCA GCTGGTGGTCCGCATGTTTT	Ja/ 28, 35
b) EBER1 (b 35- 135)	AGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCC GGGTGGT GAGGACGG TGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTC	Ja/ 35
c) EBER1 (b 84- 125)	GAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTC	Nein
d) EBER1 (b 1- 167), G4#1 und G4#2 mut	AGGACCTACGCTGCCCTAGA GGTTTTGCTAGGGAGGAGACGTGTGTG GGT GTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCC GTGTGCTGAGTACG GTGTCTGT GGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTG GTGGTCCGCATGTTTT	Nein
e) EBER1 (b 35- 135), G4#1 mut	AGACGTGTGTGCCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCC GTGTGCTG AGTACG GTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTC	Nein
f) Unstrukturierte RNA (b 1- 167)	TAATACGACTCACTATAAGGAAAACATGCTTACTACCAGCTGGTACTTGAC CGAAGACGGCAGAAAGCATATTTTGTGAATATAATCACAGACACCGTTCT CACCACCCGGGACTTGTATCTGGTACGGTTGTCTATATCCACACACGTCTC CTCCCTAGCAAAACCTTTATGTCAGCTTATGTCCT	Nein

B



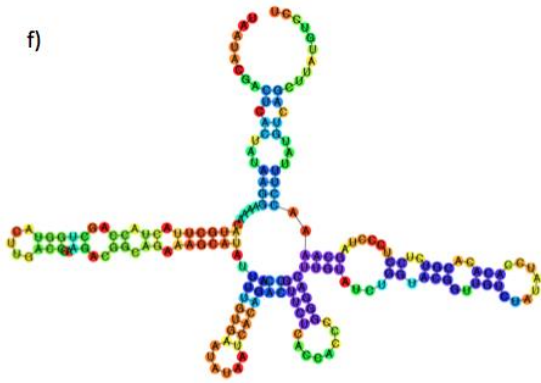


Abb. 4.5: Sequenzen und Sekundärstrukturen der *in vitro* transkribierten RNAs. (A) a-e) Sequenzen der RNAs, die über *in vitro* Transkription synthetisiert und in EMSAs auf Bindung zu EBNA1 untersucht wurden. Orange und blau hinterlegte Sequenzen mit fettgedruckten G-Nukleotiden kennzeichnen vorhergesagte G-Quadruplex Motive (G4-Motive), ermittelt über die „QGRS Mapper“ Software [181]. Gelb markierte Nukleotide in orange und blau hinterlegten Sequenzen kennzeichnen die eingefügten Punktmutationen, welche die einzelnen G4-Motive aufheben. **(B) (a-e)** Sekundärstrukturen der einzelnen RNAs, die über „The Vienna RNA Websuite“ ermittelt wurde [179,180]. Die hinterlegten Farben kennzeichnen die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarungen bzw. für einzelsträngige RNA-Abschnitte innerhalb der Sekundärstruktur von blau (nicht wahrscheinlich) bis rot (sehr wahrscheinlich).

In Abb. 4.5B b und c sind die Fragmente von EBER1 dargestellt, die aus dem partiellen Verdau des EBNA1-EBER1 Komplex resultieren. Dabei wird ersichtlich, dass EBER1 (b 35-135) (Abb. 4.5B b) ein Bereich der EBER1 mit drei „Stem-Loop“ Strukturen ist (III-V). Mit längerer Inkubationszeit mit RNase T1 wurde diese potentielle Interaktionsdomäne auf eine einzige „Stem-Loop“ Struktur von EBER1, EBER1 (b 84-125) (Abb. 4.5B c), reduziert (V). Die Ergebnisse des partiellen Verdau deuten darauf hin, dass EBNA1 bevorzugt die „Stem-Loop“ Strukturen von EBER1 bindet. Nach dem partiellen Verdau bleibt das zweite G4-Motiv in EBER1 (b 35-135) erhalten. Hingegen ist es in EBER1 (b 84-125) nicht mehr präsent (Abb. 4.5A c). Durch eine Mutation der G4-Motive wird zwar das Potential zur Ausbildung der G4-Strukturen verhindert (G-score ist null. Abb. 4.5A d und e), jedoch wird die Anzahl der „Stem-Loop“ Strukturen in EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut) und EBER1 (b 35-135, G4#2 mut) nicht reduziert (Abb. 4.5B d und e).

Die unstrukturierte RNA zeigt eine niedrige Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung dieser Strukturen und diente im Folgenden als Negativ-Kontrolle.

Im EMSA wurde nun die Interaktion zwischen EBNA1, EBER1 und deren Mutanten hinsichtlich der Spezifität, der Länge, der Struktur und der G4-Motive untersucht.

4.1.2.2. EBNA1 interagiert spezifisch mit EBER1 (b 1-167)

Für die Untersuchung der Interaktion von EBER1 (und EBER1-Mutanten) mit EBNA1 in EMSA wurden zuerst die einzelnen RNAs *in vitro* transkribiert. Dies erfolgte auch später für den *in vitro* „ORC pull-down“ Versuch. Die entsprechenden DNA-Sequenzen wurden nach der Promotor-Sequenz der T7-RNA-Polymerase im pJet-Vektor kloniert und die *in vitro*-Transkription nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde für die EMSAs durch den Einbau von zugefügtem ^{32}P -UTP radioaktiv markiert. Das EBNA1-Protein wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt, allerdings ohne die flexiblen repetitiven Glyzin-Alanin-Sequenzen, da diese die Reinigung von EBNA1 erschweren [183]. Dadurch werden die Funktionen von EBNA1 für Erhalt und Replikation nicht beeinträchtigt (244). Zugleich wurde eine EBNA1-Mutante generiert und gereinigt, in der in den drei RGG-Motiven alle Arginin- mit Alanin-Aminosäuren ausgetauscht wurden. Für diese RGG-Mutante wird keine Interaktion mit RNA erwartet.

Für die Analyse im EMSA wurde die Komplexbildung zwischen Protein und entsprechender RNA für 15 min auf Eis erlaubt und die Proben in nicht-denaturierender Gelelektrophorese im 5 %igen Polyacrylamid-Gel analysiert. Da Sekundär- und Tertiärstrukturen von RNA im Gel erhalten bleiben, erlaubt der EMSA die Analyse von Struktur-abhängigen Protein-RNA Wechselwirkungen.

Für die EMSA Experimente wurden 160 fmol ^{32}P -EBER1 und ein 4-facher bzw. 8-facher Überschuss an EBNA1 Protein eingesetzt (30 nM bzw. 60 nM).

In Abb. 4.6A erkennt man, dass EBER1 im Polyacrylamid-Gel mehrere Banden von unterschiedlicher Mobilität bildet (Abb. 4.6A, Spur 1). Dies kann damit erklärt werden, dass mehrere strukturelle Konformationen der ^{32}P -EBER1-RNA im Gel vorliegen. Ein 4-fach molarer Überschuss von EBNA1 zu EBER1 resultiert in keiner detektierbaren Komplexbildung (Abb. 4.6A, Spur 2). Bei Zugabe von EBNA1 im 8-fachen molaren Überschuss hingegen, bilden sich ^{32}P -EBER1-EBNA1 Komplexe unterschiedlicher Mobilität aus (Abb. 4.6A, Spur 3). Das deutet darauf hin, dass ein bestimmter molarer Überschuss von EBNA1 über EBER1 für die Komplexbildung benötigt wird. Es liegen drei ^{32}P -EBER1-EBNA1 Komplexe vor, die sich in ihrem Laufverhalten im Gel unterscheiden (Abb. 4.6A, Spur 3, Nummern 1-3). Eine Erklärung hierfür kann im Zusammenhang eines weiteren RGG-Proteins, HMGA1a, gefunden werden. Für HMGA1a ist bekannt, dass es die Fähigkeit zur DNA-Vernetzung über die RGG-

Motive vermittelt und somit gleichzeitig mehrere DNA-Moleküle binden kann [184]. Diese Funktion ist auch für EBNA1 im RNA-Kontext möglich. Da alle drei RGG-Motive in EBNA1 die Fähigkeit haben RNA zu binden [130], ist es vorstellbar, dass EBNA1 gleichzeitig mehrere Moleküle an EBER1 bindet und Komplexe in unterschiedlich stöchiometrischem Protein:RNA Verhältnis bildet.

Die Stärke der Interaktion von EBNA1 mit EBER1 (b 1-167) wurde in Kompetitionsstudien untersucht. Als spezifischer Kompetitor wurde eine *in vitro* transkribierte unmarkierte EBER1-Sequenz sowie tRNA als unspezifischer Kompetitor verwendet. Die Kompetitor-RNAs wurden vor der Zugabe der markierten EBER1 hinzugefügt.

Bei Zugabe eines 2-fach molaren Überschusses unmarkierter EBER1 zu ^{32}P -EBER1 wird der EBNA1- ^{32}P -EBER1-Komplex aufgehoben (Abb. 4.6A, Spur 6). Hingegen wird bei einem 14-fachen molaren Überschuss an tRNA noch EBNA1- ^{32}P -EBER1 Komplexbildung beobachtet, die erst bei einem 70-fachen molaren Überschuss an tRNA aufgehoben ist (Abb. 4.6A, Spur 10 im Vergleich zu Spur 11). Die exakte molare Menge an tRNA zur Aufhebung des EBNA1- ^{32}P -EBER1 Komplex wurde jedoch nicht bestimmt. Das Ergebnis bestätigt die Spezifität der Interaktion, zwischen EBER1 (b 1-167) und EBNA1.

Um die Bedeutung der RGG-Motive für die EBER1 Interaktion zu untersuchen, wurde ^{32}P -EBER1 (b 1-167) zusammen mit der EBNA1-RGG-Mutante inkubiert und im EMSA analysiert (Abb. 4.6A, Spuren 12 und 13). Die Interaktion von EBER1 und EBNA1 wird durch die Mutation in den RGG-Motiven von EBNA1 aufgehoben. Somit wird gezeigt, dass die Interaktion von EBER1 (b 1-167) zu EBNA1 über die RGG-Regionen verläuft.

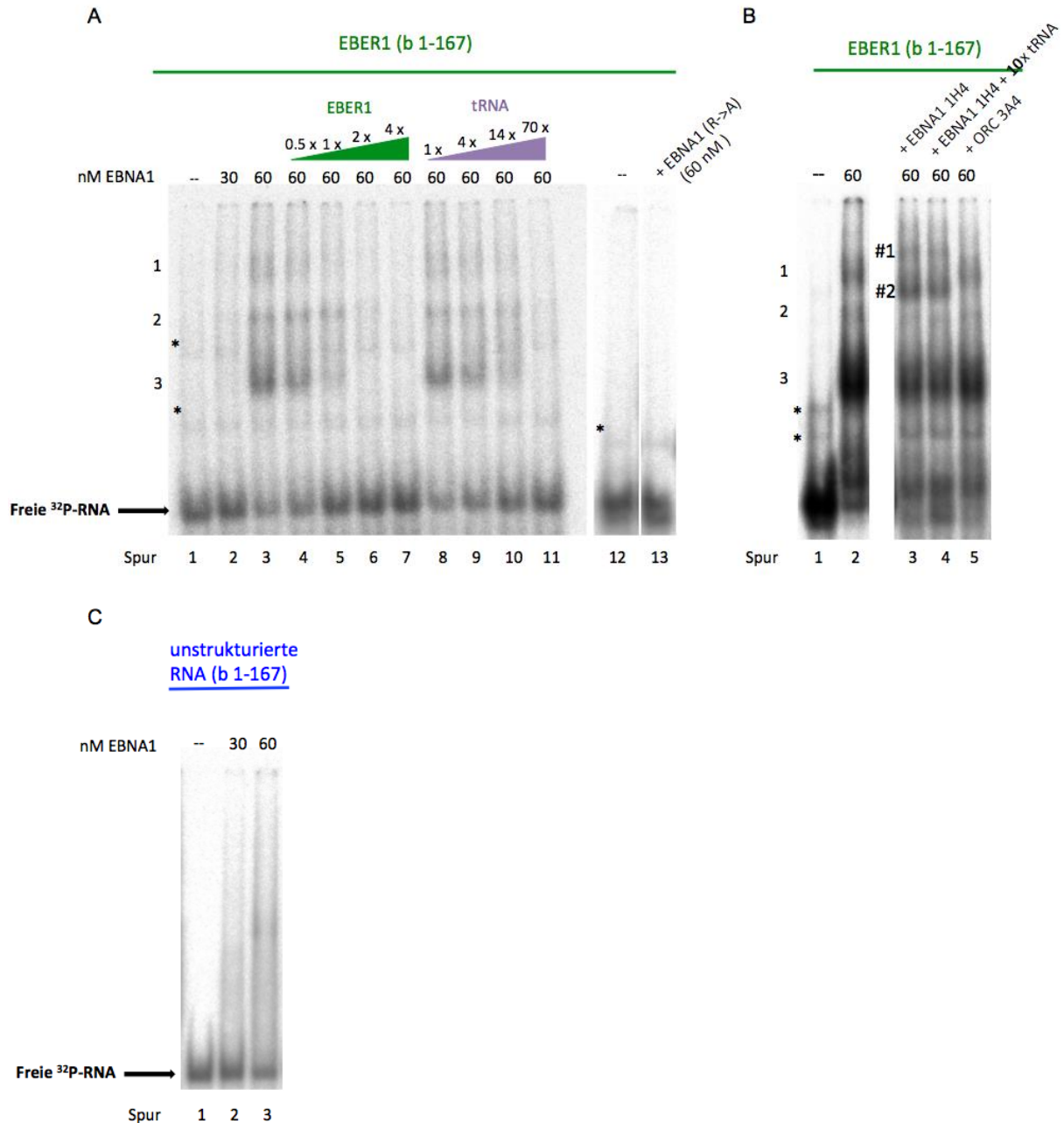


Abb. 4.6: EBNA1 bindet spezifisch an EBER1. **(A)** Gereinigtes EBNA1 Protein wurde auf die Bindung zu ³²P-EBER1 (b 1-167) im EMSA überprüft. Die freie RNA wird durch einen Pfeil gekennzeichnet. 1, 2 und 3 kennzeichnen die Höhe von EBNA1-³²P-EBER1 Komplexe. Die Spezifität der Interaktion zwischen EBNA1 und ³²P-EBER1 wurde anhand von Kompetitionsstudien untersucht. Nicht-markierte EBER1 und tRNA wurden im x-fachen molaren Überschuss zur EBER1 untersucht (EBER1: 0,5 x, 1 x, 2 x, 4 x (grün); tRNA: 1 x, 4 x, 14 x, 70 x (violett)). Die Abhängigkeit vom RGG-Motiv von EBNA1 für die Interaktion wurde durch die Verwendung EBNA1-RGG-Mutante (EBNA1 R->A) bestätigt. * kennzeichnet die Höhe von verschiedenen Sekundärstrukturen von ³²P-EBER1 im PAGE. 30, 60: Zugabe von 30 bzw. 60 nM EBNA1 zur Reaktion. **(B)** Identifizierung von EBNA1 im EMSA über Supershift. Gereinigtes EBNA1 Protein wurde mit ³²P-EBER1 (b 1-167) inkubiert und zu dieser Reaktion wurden entweder anti-EBNA1 1H4, 1H4 + tRNA im 10-fachen molaren Überschuss zu ³²P-EBER1 (b 1-167) und anti- Orc3 Antikörper (3A4) als Isotyp-Kontrolle hinzugegeben und im EMSA hinsichtlich eines Supershifts untersucht. Die freie RNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. 1, 2 und 3 kennzeichnen die Höhe von EBNA1- EBER1 (b 1-167) Komplexe im PAGE. 60: Zugabe von 60 nM EBNA1 zur Reaktion. * kennzeichnet die Höhe von verschiedenen Sekundärstrukturen von ³²P-EBER1 (b 1-167). #1 und #2 kennzeichnen die Höhe von Supershift-Banden des EBNA1:EBER1:Antikörper Komplexes. **(C)** Gereinigtes EBNA1 Protein wurde auf die Bindung zu ³²P-unstrukturierter RNA im EMSA überprüft. 30, 60: Zugabe von 30 bzw. 60 nM EBNA1 zur Reaktion.

Um auszuschließen, dass Kontamination in der EBNA1-Reinigung für den Shift im EMSA verantwortlich ist, wurde EBNA1 anhand eines spezifischen Antikörpers im RNA-Protein-Komplex identifiziert. Der EBNA1-spezifische monoklonale Antikörper 1H4 (Ratte IgG2a) wurde nach der Bildung des EBNA1-³²P-EBER1-Komplexes zur Reaktion hinzugegeben. Anti-Orc3 3A4 Antikörper diente als Isotyp-Kontrolle. Bei Zugabe von Anti-EBNA1 1H4 bilden sich zwei zusätzliche Komplexe mit geringerer Mobilität (Abb. 4.6B, Spur 3, gekennzeichnet mit #1 und #2). Die Intensität der drei verschiedenen EBNA1-³²P-EBER1-Komplexe 1-3 nimmt ab. Die Zugabe von tRNA im 10-fachen Überschuss zu ³²P-EBER1 hat keinen Einfluss auf die trimären Komplexe (Abb. 4.6B, Spur 4). Mit der Zugabe der Isotyp-Kontrolle werden keine zusätzlichen Komplexe von geringerer Mobilität erhalten (Abb. 4.6B, Spur 5). Dies zeigt, dass Anti-EBNA1 1H4 spezifisch EBNA1 im EBNA1-³²P-EBER1-Komplex erkennt und dass EBNA1 für die Mobilitätsänderung der markierten EBER1 RNA im EMSA verantwortlich ist.

Inwieweit die Struktur ausschlaggebend für die EBNA1-EBER1 Interaktion ist, wurde unter Verwendung einer unstrukturierten RNA untersucht. Für diese RNA ist die Wahrscheinlichkeit einer thermodynamisch stabilen Sekundärstruktur sehr gering (Abb. 4.5B f). Ein 4- bis 8-facher Überschuss an EBNA1 zu unstrukturierter RNA zeigt keine diskreten Banden wie bei der EBER1-EBNA1 Interaktion, sondern diffuse Signale, die mit einer ionischen Wechselwirkung des, an basischen Aminosäuren reichen, EBNA1 Proteins und/oder einer unspezifischen Interaktion der C-terminalen Domäne von EBNA1 mit EBER1 erklärt werden könnten (Abb. 4.6C, Spuren 2 und 3). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass EBNA1 spezifisch an EBER1 bindet und bestätigt weiter die Hypothese, dass EBNA1 eine Präferenz für Sekundärstruktur-Elemente besitzt. Zusammenfassend kann eine spezifische RGG-abhängige Interaktion von EBNA1 zu EBER1 in den EMSA-Experimenten beobachtet werden.

4.1.2.3. EBNA1 bindet Struktur-abhängig an EBER1

Nach RNase T1 Verdau des EBNA1-EBER1 Komplex wurden die Fragmente EBER1 (b 35-135) und EBER1 (b 84-125) als potentielle Interaktionsdomänen identifiziert. Die verkürzten Varianten von EBER1 wurden nun hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an EBNA1 im EMSA analysiert. Dabei bilden sich mit der EBER1 (b 35-135), die drei „Stem-Loop“ Strukturen besitzt, vier distinkte EBNA1-³²P-EBER1 (b 35-135) Komplexe (Abb. 4.7A, Spur 2, gekennzeichnet mit 1-4).

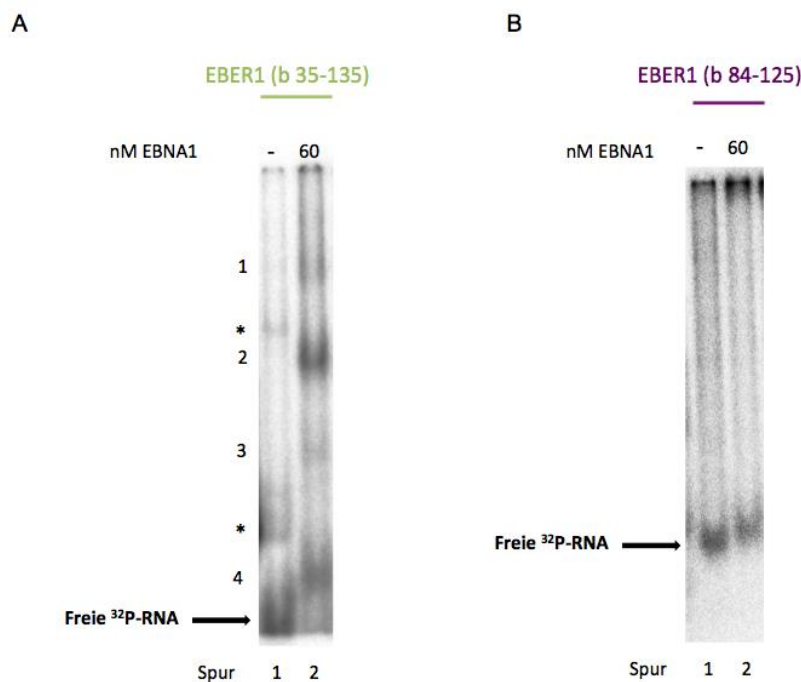


Abb. 4.7: EBNA1 bindet in Abhängigkeit von der Länge an EBER1. Gereinigtes EBNA1 Protein wurde auf die Bindung zu (A) ³²P-EBER1 (b 35-135) und (B) ³²P-EBER1 (b 84-125) im EMSA überprüft. Die freie RNA wird durch einen Pfeil gekennzeichnet. 1, 2, 3 und 4 kennzeichnen die Höhe von EBNA1-³²P-EBER1 Komplexe im PAGE. * kennzeichnet die Höhe von verschiedenen Sekundärstrukturen von ³²P-EBER1 im PAGE. 30, 60: Zugabe von 30 bzw. 60 nM EBNA1 zur Reaktion.

Die Variante EBER1 (b 84-125), die nur eine „Hairpin“ Struktur von EBER1 darstellt, wird nicht mehr von EBNA1 gebunden (Abb. 4.7B, Spur 2). Das Ergebnis zeigt, dass für eine stabile Interaktion zwischen EBNA1 und EBER1 eine bestimmte Länge oder Struktur von EBER1 notwendig ist. Eine weitere Eingrenzung der Länge von EBER1 wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter durchgeführt. Im Folgenden wurde die Abhängigkeit von strukturellen Elementen in der EBER1 für die Interaktion untersucht.

4.1.2.4. Die EBNA1-EBER1 Interaktion ist G4-unabhängig

EBNA1 zeigt *in vitro* eine starke Präferenz für RNAs, die einen hohen Guanin (G)-, Uracil (U)- und Guanin+Uracil Nukleotidanteil enthalten [130,166]. Um zu untersuchen, ob EBNA1 eine Präferenz für die G4-Motive von EBER1 hat, wurden die G4-Mutanten von EBER1 (b 1-167) und EBER1 (b 35-135) im EMSA auf Bindung zu EBNA1 getestet. Dabei sieht man, dass EBNA1 sowohl an die Doppelmutante von EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut) (Abb.4.8A, Spur 4) als auch an die verkürzte Variante EBER1 (b 35-135, G4#2 mut) bindet (Abb. 4.8B, Spur 4). Dies zeigt, dass die Interaktion von EBNA1 zu EBER1 nicht über die G4-Motive vermittelt wird.

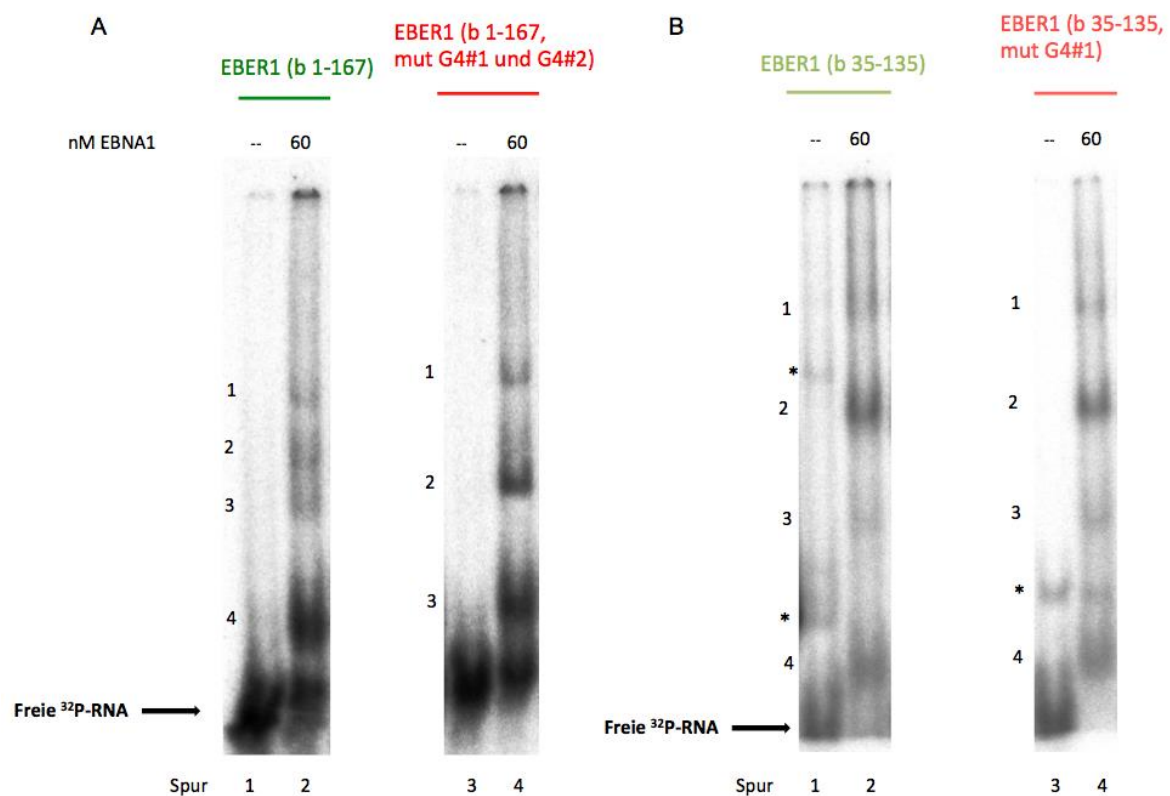


Abb. 4.8: EBNA1 bindet G4-unabhängig an EBER1. Gereinigtes EBNA1 Protein wurde auf die Bindung zu den EBER1-G4-Mutanten ³²P-EBER1 (b 1-167, mut G4#1 und G4#2) und ³²P-EBER1 (b 35-135, mut G4#1) im EMSA überprüft. Die freie ³²P-RNA wird jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. 1, 2, 3 und 4 kennzeichnen EBNA1-RNA Komplexe. * kennzeichnet die Höhe von verschiedenen Sekundärstrukturen von ³²P-EBER1 (b 35-135, mut G4#1) im PAGE. 60: Zugabe von 60 nM EBNA1 zur Reaktion.

Während mit der EBER1 (b 1-167) in diesem Fall vier Komplexe mit EBNA1 gebildet werden, sind es mit der EBER1-Doppelmutante drei Komplexe, wie sie in den

vorangegangenen EMSAs mit EBER1 erhalten wurden. Die Anzahl an gebildeten Komplexen bleibt für die verkürzte EBER1 und deren G4-Mutante gleich. Aufgrund von Spannungsschwankungen bei der Elektrophorese ist es denkbar, dass in diesem Fall vier anstatt drei EBNA1-EBER1 Komplexe auftreten.

Ein Vergleich der Sekundärstrukturen von EBER1 (1-167) mit EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut) zeigt, dass die Anzahl an potentiellen „Stem-Loop“-Strukturen von 5 auf 7 gestiegen ist (vergleiche a und d in Abb. 4.5B). Für die verkürzte EBER1-Variante zeigt die Sekundärstrukturvorhersage ebenfalls eine Erhöhung um einen „Stem-Loop“. Dies könnte eine Erklärung für die verstärkte Assoziation von EBNA1 zu EBER1 (b 1-167, G4#1 und G4#2 mut) und EBER1 (b 35-135, G4#2 mut) sein und wäre eine Bestätigung für die Affinität von EBNA1 zu hochstrukturierten Bereichen von RNA. Obwohl G4-Strukturen ebenso hochstrukturierte Bereiche darstellen, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass EBNA1 eher eine Spezifität für „Multistem-Loop“-Strukturen als zu G4-Strukturen hat.

4.1.2.5. Die EBNA1-ORC Interaktion wird in Anwesenheit von EBER1 *in vitro* signifikant erhöht

Die EBNA1-EBER1 Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit im vorangegangenen Kapitel als spezifische Interaktion bestätigt. Es ist aber unklar, ob EBER1 eine Rolle bei der Bildung des pre-RC im Kontext von EBV spielt. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob EBER1 die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC vermittelt.

Dies wurde nicht anhand von EMSA-Experimenten untersucht, da keine gereinigten Proteinkomponenten von ORC zur Verfügung standen. Anstelle dessen wurde ein *in vitro* ORC „pull-down“ Versuch etabliert, der Kernextrakte, gereinigtes EBNA1 und EBER1 verwendet (Abb. 4.9). Dabei wurde Orc3 stellvertretend für den hexameren Komplex immunpräzipitiert. Um das im Kernextrakt enthaltene ORC an Sepharose A Kügelchen (Beads) zu binden, wurden zunächst anti-Orc3 Antikörper kovalent gekoppelt. Die Antikörper-assoziierten Beads wurden einer Immunpräzipitation mit HeLa-Kernextrakt unterzogen, der vor der Immunpräzipitation mit rekombinantem EBNA1-Protein und mit oder ohne *in vitro* transkribierter EBER1 angereichert wurde. Nach Waschen der Beads wurde der präzipitierte Komplex mit Lämmli-Puffer eluiert.

Über SDS-PAGE mit anschließendem Immunblot wurde der Komplex auf die EBNA1-Co-Immunpräzipitation analysiert.

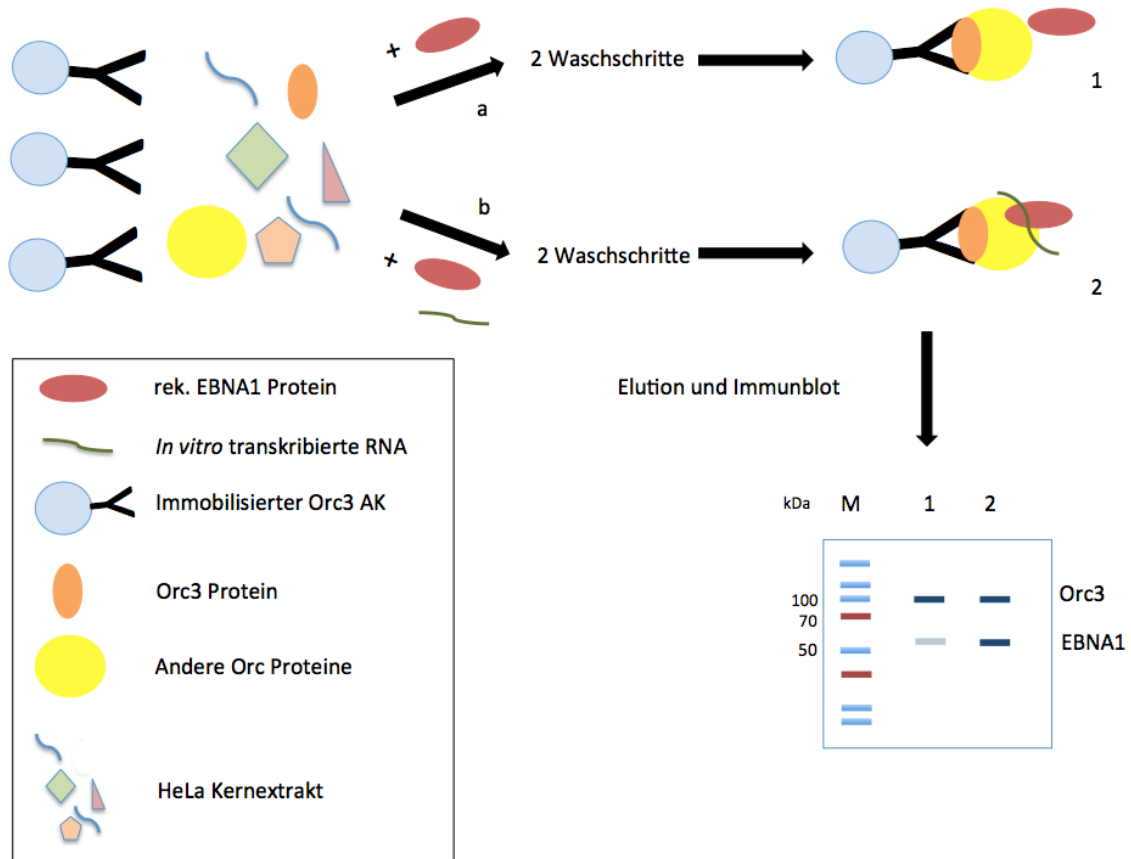


Abb. 4.9: Schema des *in vitro* ORC „pull-down“ Versuchs. An Protein A Sepharose Beads immobilisierter Orc3 Antikörper (AK) wird mit HeLa Kernextrakt angereichert mit (a) rekombinantem EBNA1 Protein oder (b) rekombinantem EBNA1 Protein zusammen mit *in vitro* transkribierter RNA inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgt die Elution des immunpräzipitierten Proteinkomplex und die Analyse über Immunblot gegen Orc3 und EBNA1. Bei der Annahme einer verstärkten Assoziation von EBNA1 zu Orc3 in Anwesenheit von RNA (Spur 2) wird im Immunblot ein stärkeres Signal für EBNA1 im Vergleich zur Kontrolle erwartet (Spur 1).

Aus Abb. 4.10A geht hervor, dass Orc3 mit dem spezifischen Antikörper erfolgreich immunpräzipitiert wurde (Spuren 5 und 7). Die Negativ-Kontrolle mit Präimmunserum zeigt keine Anreicherung von Orc3 (Spur 3). Der EBNA1 Immunblot dokumentiert dann die Effizienz mit der das virale Protein mit ORC interagiert. EBNA1 zeigt eine unspezifische Wechselwirkung mit den Präimmunserum Antikörper bzw. mit den Sepharose A Beads (Spur 3). Um den Hintergrund zu subtrahieren wurden die EBNA1-Signale im Immunblot mit der Bildbearbeitungssoftware Fiji quantifiziert und in das Verhältnis zu dem EBNA1-Signal ohne EBER1 gesetzt. In Anwesenheit von EBER1 wird im Durchschnitt von 5 Experimenten eine spezifische Erhöhung der

EBNA1 Assoziation zu Orc3 um das ca. 3-fache gegenüber der Co-Immunpräzipitation ohne EBER1 beobachtet (Abb. 4.10B)

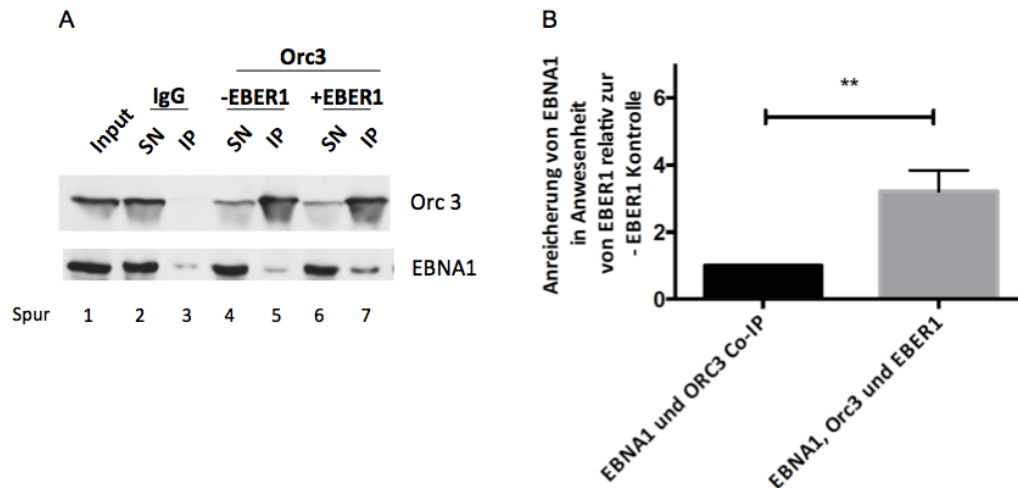


Abb. 4.10: EBER1 verstärkt die Bindung zwischen EBNA1 und ORC im *in vitro* ORC pull-down Versuch. (A) Immunblots gegen Orc3 und EBNA1 für die IgG Kontroll- Immunpräzipitation und für die EBNA1 Immunpräzipitation mit und ohne EBER1. (B) Relative Anreicherung von rekombinantem EBNA1 an Orc3 in Anwesenheit von EBER1 im Vergleich zur Co-Immunpräzipitation ohne EBER1. Signale von EBNA1 im Immunblot wurden mit Image J quantifiziert und die relative Anreicherung bzgl. der Signale für EBNA1 in der IP ohne EBER1 ermittelt (n=5). Die statistische Analyse unter Verwendung des doppelten unabhängigen *t*-Tests ergab einen *p*-Wert von 0,0075 und ist mit ** gekennzeichnet.

Zusammenfassend wird im Rahmen dieser Doktorarbeit die spezifische EBNA1-EBER1 Interaktion über EMSA-Experimente bestätigt. Die Interaktion ist abhängig von dem RGG-Motiv in EBNA1 und verläuft vermutlich abhängig von Sekundärstrukturen und G4-unabhängig. EBER1 stellt eine spezifische RNA dar, die die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC um das ca. 3-fache *in vitro* verstärkt.

4.1.3. Die Rolle der EBER-RNAs in der EBV-Replikation *in vivo*

Sehr wenig ist über die molekularen Mechanismen von EBER1&2 und deren Funktion in infizierten Zellen bekannt. In Kapitel 4.1.1 wurde EBER1 als spezifische RNA für die EBNA1-ORC Interaktion *in vitro* bestätigt. In diesem Kapitel wird untersucht, welche Rolle die EBER-RNAs *in vivo* in der EBV-Replikation spielen und, ob sie die Interaktion an DS zwischen EBNA1 und ORC vermitteln. Für die Analyse wurden zwei verschiedene lymphoblastoide Zelllinien (LCL) verwendet, die sich

genetisch durch die Deletion der Gene für EBER1&2 unterscheiden. LCL-Zelllinien entstehen durch *in vitro* Transformation primärer B Zellen mit EBV. Im Labor lassen sich LCLs, durch Infektion mit wildtyp und mutanten Labor-Viren herstellen die durch EBV-Bacmid Technologie generiert wurden. Das wildtyp EBV Bacmid 2089 enthält das EBV-Genom sowie ein Selektionsmarker (Hygromyzin) und Reportergen (GFP). LCL generiert durch Infektion mit 2089 EBV wurde mit einer EBER^{k.o.}-LCL verglichen. Die EBER^{k.o.}-LCL wurde durch Infektion mit einem Labor-Virus etabliert, der mit einem EBV-Bacmid, in dem die Sequenzen von EBER1 und EBER2 durch das beta-Galaktosidase Gen ersetzt sind, generiert wurde (Simon Jochum, AG Zeidler, Helmholtz Zentrum München, Abteilung für Genvektoren, unveröffentlichte Daten). Zunächst wurde die EBER^{k.o.}-LCL hinsichtlich Zellwachstum, Zellzyklus und EBV-Kopienzahl charakterisiert. Danach erfolgte die Analyse der Assoziation von ORC und der Bildung des pre-RC durch Rekrutierung von MCM2-7 an DS anhand von ChIP-Analysen.

Zellwachstum

Zuerst wurde der Einfluss von den EBER-RNAs auf das Zellwachstum untersucht. Die EBER⁺-LCL wurde an Tag 0 auf 2×10^5 Zellen/ml gesetzt. Die Zelldichte der EBER^{k.o.}-LCL wurde hingegen auf 4×10^5 Zellen/ml eingestellt, da eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml zu einem Wachstumsstopp führte (persönliche Beobachtung). Nach drei Tagen wurden die Zellen gezählt und erneut auf die Anfangs-Zelldichte eingestellt. Die Zellzahlen der EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL wurden wieder nach sechs Tagen ermittelt. Die Wachstumskurven beider Zelllinien sind in Abb. 4.11 dargestellt. Für die EBER⁺-LCL steigt die Zellzahl nach drei Tagen um das 6-fache. Für die EBER^{k.o.}-LCL steigt sie hingegen um das ca. 2-fache (Abb. 4.11). Zwischen Tag 3 und Tag 6 wird für beide Zelllinien eine 1,5-fache Steigerung der Zellzahl beobachtet. Die EBER^{k.o.}-LCL zeigt somit ein langsames Wachstum im Vergleich mit der Referenz-Zelllinie EBER⁺-LCL. Möglicherweise haben die EBER1&2 einen Effekt auf die Expression von wachstumsfördernden Faktoren.

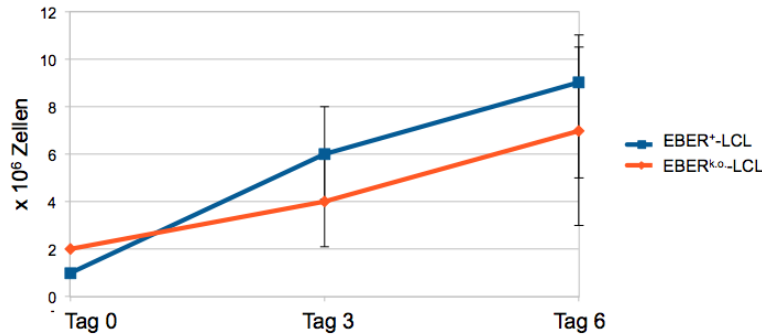


Abb. 4.11 : Einfluss von den EBER-RNAs auf das Wachstum von EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL. Gezeigt sind Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung. Die Zellzahl wurde nach drei bzw. sechs Tagen bestimmt. Wachstumskurven für die EBER⁺-LCL (blau) und EBER^{k.o.}-LCL (orange).

Zellzyklus-Analyse

In diesem Abschnitt wird darauf eingegangen, ob eine Deletion der EBER-RNAs einen Einfluss auf den Zellzyklus der Zellen hat.

Dafür wurden EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL sechs Tage wie zuvor beschrieben in Kultur gehalten. An Tag 6 wurden ca. 1×10^6 Zellen für die FACS-Analyse geerntet und vorbereitet. Die FACS-Analyse erfolgte wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurde.

Für das Zellzyklusprofil wurde die Anzahl der Zellen im Gate gegen die Intensität der PI-Emission aufgetragen. Die EBER⁺-LCL zeigt eine normale Verteilung von G1- und G2-Phase Zellen (Abb.4.12A). Der DNA-Gehalt steigt aufgrund der Proliferation in S-Phase und ist in G2 doppelt so groß wie in G1. Eine Deletion der EBER-RNAs hat somit keinen Einfluss auf den Zellzyklus der EBER^{k.o.}-LCL (Abb.4.12B (2)).

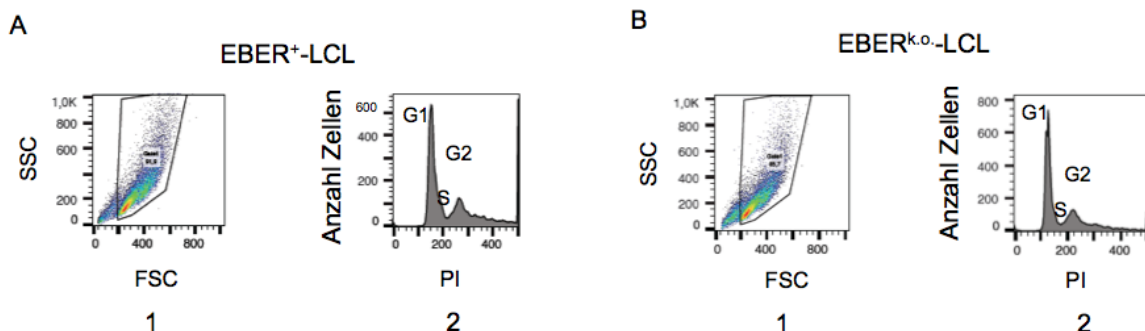


Abb. 4.12: Einfluss von EBER1 auf das Zellzyklusprofil von EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL. FACS Analyse nach 6 Tagen. Die Zellen wurden geerntet, fixiert und die DNA mit Propidium-Iodid gefärbt, um die einzelnen Zellzyklusphasen mittels FACS Analyse zu visualisieren (2). Exemplarisch ist ein Experiment gezeigt. 1: Darstellung nach Größe der Zellen, 2: PI: Propidiumiodid, Zellzyklusphasen G1: G1-Phase, S: S-Phase, G2: G2-Phase. **(A)** FACS Analyse der EBER⁺-LCL. **(B)** FACS Analyse der EBER^{k.o.}-LCL.

Bestimmung der relativen EBV-Kopienzahl

In diesem Abschnitt soll analysiert werden, welche Bedeutung die EBER1&2 RNAs auf die Replikation des EBV-Genoms haben. Hierfür wurden die relativen EBV-Kopien der EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL bestimmt und miteinander verglichen. Die Raji-Zelllinie diente als Referenz. Raji-Zellen wurden wie die EBER⁺-LCL auf 2×10^5 Zellen/ml und die EBER^{k.o.}-LCL auf 4×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden wie im Kapitel „Zellwachstum“ beschrieben in Kultur gehalten. An Tag 6 wurde die Gesamt-DNA aus 1×10^6 Zellen über Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Die relative Quantifizierung des EBV-Genoms erfolgte über qPCR. Es wurde weiter wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben vorgegangen.

Für den Calibrator wurden 10 ng Gesamt-DNA aus Raji-Zellen als Replikat eingesetzt. Das Konzentrationsverhältnis des Calibrators wurde von der Software auf 1 gesetzt und die Verhältniswerte von Ziel- zu Referenz der Proben des Calibrator-Wertes normalisiert. D.h. die Ergebnisse der relativen EBV-Kopien in EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL werden im Folgenden als Änderung des Verhältnisses zum Raji-Calibrator ausgedrückt. Somit kann die Aussage getroffen werden inwiefern sich die EBV-Kopienzahl in den beiden Zelllinien unterscheidet.

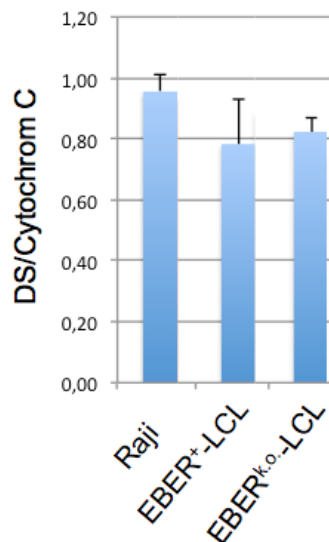


Abb. 4.13 : Die relative EBV-Kopienzahl in Raji-Zellen, EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL. Gesamt DNA wurde aus den Zellen isoliert und das relative Verhältnis von EBV zur genomischen DNA mittels quantitativer PCR mit Primern für DS und Cytochrom C bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung.

In Abb. 4.13 sind die relativen EBV-Genom-Verhältnisse (DS/Cytochrom C) in Bezug zum Raji-Calibrator dargestellt. Für Raji-Zellen ist der Wert des Verhältnisses von Probe zur Calibrator-Probe theoretisch 1. Für Rajis wird bedingt durch experimentelle Schwankungen ein Wert von 0,95 erhalten, für EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL Werte von 0,78 bzw. 0,82. Dies zeigt, dass die LCLs im Vergleich zu Raji-Zellen weniger EBV-Kopien enthalten. Beide LCLs unterscheiden sich nicht signifikant in der Anzahl der EBV-Kopien. Eine Deletion von EBER1&2 hat demnach keinen Einfluss auf die Kopienzahl von EBV.

Die EBNA1-ORC Interaktion an DS

Eine Deletion von EBER1&2 in EBER^{k.o.}-LCL hat keinen Einfluss auf die EBV-Kopienzahl, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Replikation des EBV-Genoms nicht beeinträchtigt wird. DS ist eine sehr effiziente Assemblierungsstelle für den pre-RC [89-91,185]. Die Studie von Ott et al., (2011) zeigte außerdem, dass er der aktivste Origin in mit mini-EBV infizierten LCLs ist. Das mini-EBV enthält alle viralen Sequenzen, außer denjenigen die für den lytischen Zyklus des Virus benötigt werden [186]. Dennoch führt eine Entfernung des DS-Motivs sowohl vom EBV-Genom als auch von der mini-EBV-Sequenz zu keiner Veränderung der Replikationsaktivität in transformierten B-Zellen, da andere Replikationsstartstellen von „ruhenden“ Origins, induziert werden [97,187]. Im Kontext der EBER-RNAs könnte das bedeuten, dass zwar die EBER-RNAs die Interaktion von EBNA1 und ORC an DS vermitteln und dies zur Bildung des pre-RC führt, jedoch in EBER-defizienten Zellen die Interaktion inhibiert und die Replikation an anderen Stellen induziert wird. Wenn diese Hypothese zutrifft, wären ORC und MCM2-7 Proteine in der EBER^{k.o.}-LCL nicht mehr an DS assoziiert. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Assoziation von Orc2 und Mcm3 an DS in EBER⁺- und EBER^{k.o.}-LCL anhand von ChIP untersucht. Raji-Zellen dienten als Positiv-Zelllinie für die Assoziation von Orc2 und Mcm3 an DS. Die ChIP wurde wie im Kapitel 4.1.1 durchgeführt. Spezifische Primer-Paare (Tab 2.9) wurden in der quantitativen PCR verwendet, um die Anreicherung von Orc2 und Mcm3 an DS zu detektieren. Als Negativ-Lokus für Orc2 und Mcm3 dienten FR als virales Element und der lytische Replikationsursprung von EBV OriLyt. Die Anreicherung der

einzelnen Proteine wurde in Bezug auf die IgG-Kontrolle berechnet und auf die Anreicherung am Negativ-Lokus OriLyt normalisiert (Abb. 4.14).

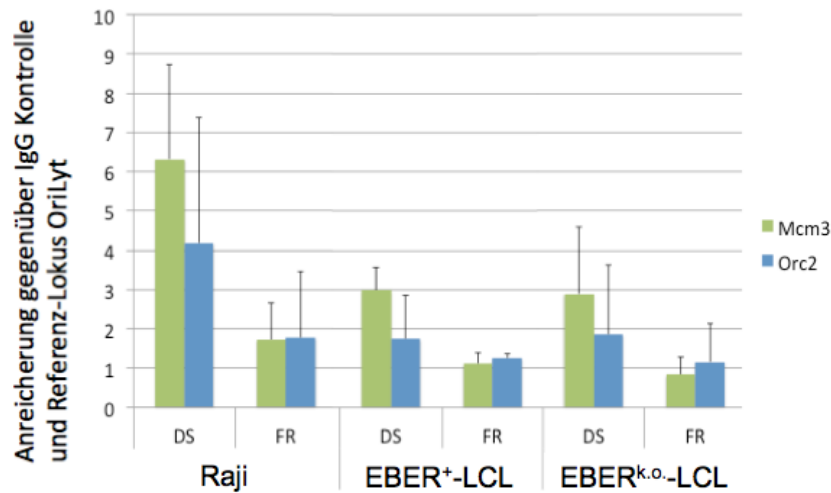


Abb. 4.14: ChIP-Analysen von Orc2 und Mcm3 Proteinen an DS in Abhängigkeit von den EBER1&2. Die Zelllinien Raji, EBER⁺-LCL und EBER^{k.o.}-LCL wurden fixiert und der ChIP-Analyse unterzogen. Raji-Zellen dienen als Referenz. Das „dyad symmetry“ Element (DS) dient als Positiv-Referenzloкус für die Assoziation von Orc2 und Mcm3. Gezeigt sind die Ergebnisse nach der Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Orc2 (blau), Mcm3 (grün) und EBNA1 (rot) sowie mit einer IgG Kontrolle. Der lytische Replikationsursprung von EBV OriLyt und „family of repeats“ Element (FR) stellen die Negativ-Kontrollregionen dar. Die präzipitierte DNA wurde in der quantitativen PCR (qPCR) analysiert und die Anreicherung der spezifisch präzipitierten DNA relativ zu der aus der IgG Kontrolle dargestellt und auf die Anreicherung an OriLyt normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n=3).

Für Mcm3 und Orc2 beobachtet man eine ca. 4- bzw. 6-fache Anreicherung an DS in Raji Zellen. Der Negativ-Lokus FR zeigt hingegen keine signifikante Anreicherung. Die Anreicherung dieser Proteine ist in EBER⁺- und EBER^{k.o.}-LCL mit 2- bis 3-facher Anreicherung niedriger als in Raji-Zellen, dennoch höher als am FR-Referenzloкус. Für beide LCL-Zelllinien ist die Anreicherung auf dem gleichen Niveau. Somit ist in der EBER-defizienten LCL die ORC und MCM2-7 Assoziation nicht beeinträchtigt. Das Ergebnis gibt demnach keinen Hinweis darauf, dass die ORC-Rekrutierung und die Bildung des pre-RC an DS ohne die EBER-RNAs beeinträchtigt ist.

Zusammengefasst zeigen die Experimente mit der EBER-defizienten LCL zwar tendenziell ein langsames Zellwachstum verglichen mit der EBER⁺-LCL, aber keinen Unterschied im Zellzyklusprofil und in der relativen EBV-Kopienzahl. Außerdem spielen die EBER-RNAs keine Rolle für die Bildung des pre-RC an DS. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die EBER-RNAs keinen Einfluss auf die EBV-Replikation haben.

4.1.4. Identifizierung von spezifischen RNAs für die EBNA1-ORC Interaktion

Die G4-Abhängigkeit der EBNA1-ORC Interaktion und eine Rolle der EBER RNAs für die Replikationsfunktion von EBV konnte mit den vorangegangenen Experimenten nicht bestätigt werden. Trotzdem ist es möglich, dass die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC *in vivo* über spezifische RNAs (nicht-G4-RNAs) vermittelt wird.

EBER1 und EBER2 sind hoch abundant vorkommende virale RNAs in EBV-infizierten Zellen [119-121]. EBER1 wurde im Rahmen dieser Arbeit als ein spezifischer Interaktionspartner von EBNA1 charakterisiert. Allerdings ist aus zahlreichen *in vivo* Experimenten mit dem OriP/EBNA1-System bekannt, dass die EBER RNAs weder für die Biologie EBV-infizierter Zellen noch für die Replikation von EBV essentiell sind (Ergebnisse dieser Arbeit) [125-127]. Eine Erklärung ist, dass für die EBNA1 ORC Interaktion an DS möglicherweise zelluläre RNAs die EBER-RNAs in der EBER^{k.o.}-LCL ersetzen können.

Um nun weitere potentiell funktionelle RNAs zu identifizieren wurden RNA „pull-down“ Experimente in Raji-Zellen, EBER⁺- und EBER^{k.o.}-LCL durchgeführt. In einer EBNA1-Immunpräzipitation wurden RNAs angereichert, die spezifisch an EBNA1 binden. Nach Isolierung und Umschreiben der EBNA1-assoziierten RNAs in cDNA wurden Proben zur Sequenzierung gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation (RIP) anhand der EBNA1-Immunpräzipitation etabliert. Die Zelllinie EBER^{k.o.}-LCL wurde verwendet um spezifische zelluläre Kandidaten-RNAs leichter zu identifizieren, da in Raji-Zellen und EBER⁺-LCL die EBER-Expression sehr hoch ist und in der nachfolgenden Sequenzierung Signale von weniger abundanten, aber spezifischen RNAs überdecken kann.

Das Protokoll wurde mit Zellen durchgeführt, in denen Protein-RNA Interaktionen durch Formaldehyd-Behandlung fixiert wurden. Dies erlaubte nach der Immunpräzipitation eine stringendere Reinigung von spezifischen EBNA1-RNA Komplexen. Die Optimierung des Protokolls wurde anhand von Raji-Zellen durchgeführt.

Die Zellen wurden lysiert und sonifiziert. Durch die Sonifizierung wurde das Chromatin-gebundene EBNA1 Protein in die lösliche Phase überführt. Anschließend erfolgte ein DNase Verdau, um die RNA anzureichern. EBNA1-RNA-Komplexe

wurden über Sepharose G Kügelchen (Beads) mit gebundenem spezifischen anti-EBNA1 Antikörper (1H4, Ratte) präzipitiert. Als Negativkontrolle dienten Beads mit immobilisiertem Ratten-IgG. Die Beads wurden nach der Immunpräzipitation mit einem Hochsalz-Puffer gewaschen, um Hintergrundbinden von RNAs an die Beads oder Antikörper zu reduzieren. Eine weitere Reduktion des Hintergrundes wurde mit einem partiellen RNase T1 Verdau der immunpräzipitierten Komplexe für 5 min angestrebt. Um die Verdaueffizienz zu bestimmen, wurden 5 ng einer *in vitro* transkribierten unstrukturierten RNA (siehe Abb. 4.5A f) zu den Reaktionen gegeben. Nach dem Verdau mit RNase T1 wurden die Überstände von unbehandelter und behandelter Reaktion gesammelt und die RNA wie die immunpräzipitierte RNA durch das Revertieren der Formaldehyd-Fixierung und Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und die so gewonnene RNA mit Ethanol gefällt. Im Anschluss wurden die RNA-Proben in cDNA umgeschrieben. Eine quantitative Auswertung über qPCR diente als eine Qualitätsüberprüfung des RIP-Protokolls. In der qPCR wurde auf eine Anreicherung folgender RNAs untersucht. Wie im Ergebnisteil 4.1.2 gezeigt bindet EBER1 an EBNA1 und diente entsprechend als Hinweis auf die Integrität der RNA-Präparation. Actin-RNA diente als Negativkontrolle als eine RNA die nicht an EBNA1 bindet. RNU1 wurde in Vorgängerversuchen als eine potentielle zelluläre RNA für die EBNA1-RNA Interaktion identifiziert und wurde deshalb zur Bestätigung der Interaktion untersucht. Für EBER1 und RNU1 wurden jeweils zwei Primerpaare verwendet, die zum einen die Gesamtlänge der RNAs (vor Verdau, Primer „extern“), und zum anderen ca. 100 b innerhalb der RNA (nach Verdau, Primer „intern“) detektierten (Tab. 2.9).

Die EBNA1-Immunpräzipitation aus den verschiedenen Zelllinien wurde anhand eines Immunblots überprüft. Abb.4.15A zeigt, dass EBNA1 aus allen Zelllinien erfolgreich präzipitiert wurde. Die Verdaueffizienz des RNase T1-Verdaus wurde anhand der unstrukturierten RNA ermittelt. Hierfür wurde nach der qPCR aus den Cp-Werten aus behandeltem und unbehandeltem Überstand die Effizienz in Prozent verdaute RNA ausgedrückt (Abb. 4.15B). Ca. 90-99% der *in vitro* transkribierten unstrukturierten RNA wurden in 5 min bei RT in Überständen verdaut. Dieser Wert steht repräsentativ für die Gesamt-RNA in der Probe. Somit kann angenommen werden, dass sämtliche EBNA1-ungebundene RNAs und IgG-gebundene RNAs erfolgreich eliminiert wurden. Die Anreicherung der RNA wurde mit der Light-Cycler-Software (Roche) über das delta-Cp-Verfahren in Bezug auf die der IgG-Kontrolle

berechnet. Die Behandlung mit RNase bewirkt ein verbessertes Verhältnis von Signal zu Hintergrund von spezifischer EBNA1-IP zur IgG-Kontrolle. Bei unbehandelter Immunpräzipitation ist für keine der untersuchten RNAs eine Anreicherung bzgl. der IgG-Kontrolle zu beobachten (Abb. 4.15C). Nach Behandlung mit RNase T1 hingegen, ergibt sich für EBER1 eine ca. 2,5-fache Anreicherung in Bezug auf die IgG-Kontrolle. Die Actin-RNA wurde im Vergleich zu EBER1 wie erwartet nicht spezifisch angereichert. Für die RNU1 wird ebenfalls eine 1,7-fache Anreicherung bei Behandlung mit RNase T1 beobachtet. Diese RNA könnte demnach eine potentielle RNA darstellen, welche spezifisch die Interaktion von EBNA1 und ORC vermittelt. Dies wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr verifiziert. Da die Experimente unter den durchgeführten Bedingungen die Qualitätsanforderungen erfüllten, wurden weitere zwei RIP-Experimente wiederholt und die isolierten Proben zur Sequenzierung gegeben. Hieraus sollen weitere Erkenntnisse gewonnen werden, welche zellulären RNAs mit EBNA1 interagieren können. Studien postulieren, dass EBNA1 bevorzugt RNAs mit hohem Anteil an Sekundärstrukturen bindet [130,131]. Interaktionsstudien zwischen EBNA1 und EBER1 in dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass die „Stem-Loop“ Strukturen in EBER1 für die Bindung zu EBNA1 entscheidend sind (siehe Kapitel 4.1.2). Deshalb kann für das Ergebnis der Sequenzierung erwartet werden, dass mehrere potentielle RNAs identifiziert werden. In diesem Fall lässt sich möglicherweise eine Gruppe von RNAs mit spezifischen strukturellen Elementen identifizieren, die für die EBNA1-ORC Interaktion eine Rolle spielen.

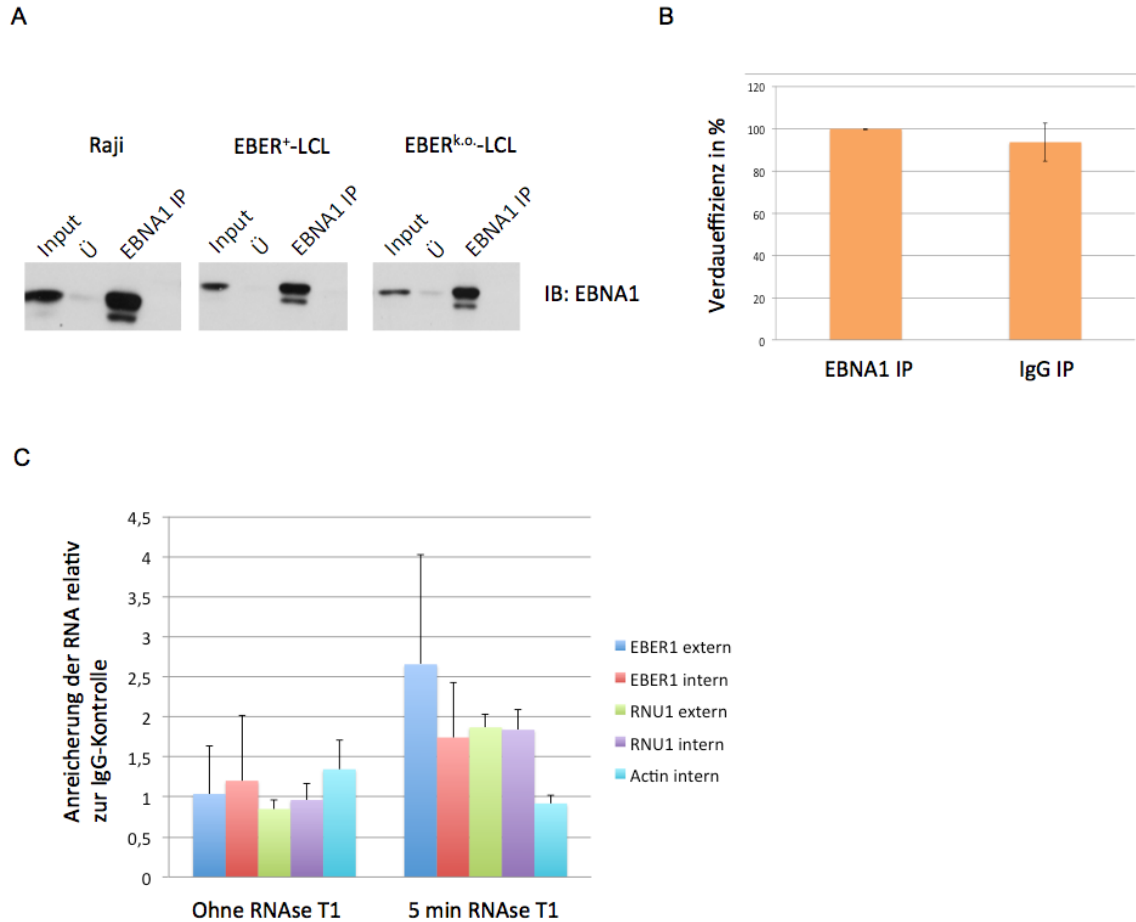


Abb. 4.15: Qualitätskontrolle für das Protokoll der RNA-Immunpräzipitation (RIP). (A) Zellextrakte von Raji-Zellen, EBER⁺- und EBER^{ko}- LCL wurden mit anti-EBNA1 Antikörper behandelt. Die EBNA1-Immunpräzipitation wurde mittels Immunblot (IB) analysiert. Gezeigt sind 1% Input und 1% Probe vom Überstand sowie 5 % der EBNA1-Immunpräzipitation. Ü bezeichnet den Überstand nach der Immunpräzipitation. (B) Verdauereffizienz in % ermittelt anhand der Menge an *in vitro* transkribierter unstrukturierter RNA vor und nach Behandlung des Überstands mit RNase T1. (C) Präzipitierte RNA aus EBNA1- sowie IgG-Immunpräzipitation wurde isoliert aus Raji-Zellen, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern in quantitativer PCR nachgewiesen und die relative Anreicherung der entsprechenden RNA gegenüber IgG dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

4.2. Die Rolle von G-Quadruplex Motiven auf die Replikation von Replikationsursprüngen im Plasmid-System

In „Short-Nascent-Strand“ (SNS) Sequenzanalysen von aktiven Replikationsursprüngen wurde eine hohe Anzahl an neuen Origins in verschiedenen Zelllinien identifiziert [11]. Interessanterweise sind viele dieser Origins mit G4-Motiven assoziiert. Die Studie von Cayrou et al., (2012) zeigte, dass bis zu 70 % der Replikationsursprünge (Origins) aus Maus und Drosophila mit G-Quadruplex (G4-) Motiven korrelieren. Die Korrelationsstudien weisen auf eine Funktion der G4-Motive auf die Replikation hin. Eine funktionelle Analyse der Replikationskompetenz in Abhängigkeit von G4-Motiven wird an ausgewählten Replikationsursprüngen im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt. Dabei wird untersucht, ob und wie G4-Strukturen die Origin-Aktivität und -Effizienz regulieren. Dies wurde in einer Kollaboration mit dem Méchali-Labor an ausgewählten Origins im OriP-Plasmid-System untersucht. Für die Untersuchung wurden neu identifizierte Sequenzen aus dem Maus-Genom verwendet, die bei ektopischer Insertion ins HeLa-Genom in „Short-Nascent-Strand“ Analysen Origin-Aktivität zeigen und mit G4-Motiven korrelieren (persönliche Mitteilung M. Méchali). Die Origins wurden mit Maus cc2 und cc4 bezeichnet. Mit unserem Kooperationspartner einigten wir uns auf 2 kb bzw. 1,9 kb Länge für cc2 und cc4 Origins, die im OriP-Plasmid-System auf Replikationskompetenz untersucht wurden (Abb. 4.16).

Zudem wurde jeweils eine Kernsequenz von 500 bp eingegrenzt, die ebenso G4-Motive enthält und Origin-Aktivität im ektopischen Kontext zeigte und bei der die Replikation durch das G4-bindende Molekül PhenDC3 inhibiert wird (persönliche Mitteilung M. Méchali) (Abb. 4.16). In dieser Arbeit wurde zum einen im OriP Plasmid-System untersucht, inwiefern G4-Strukturen in cc2 und cc4 zur Origin-Aktivität beitragen. Zum anderen wurde die Hypothese überprüft, ob ORC direkt an die G4-Motive bindet und Assemblierungsstellen für den pre-RC kennzeichnet.

Die zwei G4-Motive G4#1 und G4#2 des cc2 500 bp Fragments dienten als anschauliches Beispiel, um die Rolle und Wirkungsweise der G4-Motive auf die Replikationseffizienz des cc2 500 durch Mutationsstudien zu untersuchen. Das OriP-Plasmid (p3230) wurde zusammen mit dem Plasmid, das den c- Myc-Origin (p5641)

enthält als Positiv-Referenzplasmid für die Versuche herangezogen. Das 1,2 kb Fragment ist im autonomen OriP-Plasmid-System und im ektopischen Kontext ein effizienter Replikationsursprung [188-192]. Interessanterweise enthält der c-Myc Origin auch einige G4-Motive (Abb. 4.16).

Anhand von Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde zudem die Interaktion von den Proteinen der Replikationsmaschinerie mit den G4-Motiven untersucht.

In den nächsten Kapiteln wird der Plasmid-Wiedergewinnungsversuch als Methode zur Bestimmung der Replikationseffizienz näher erklärt. Außerdem werden die verschiedenen Mutanten des cc2 für die Funktionsanalyse vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse zu den Plasmid-Wiedergewinnungsexperimenten und zuletzt diejenigen der ChIP-Experimente dargestellt.

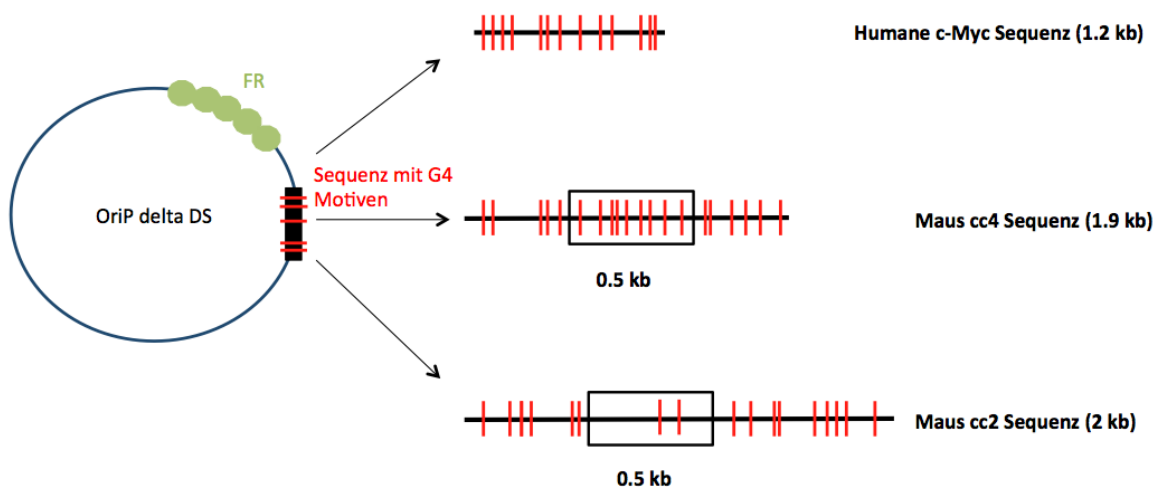


Abb. 4.16: Definierte Origins wurden im Plasmid- Wiedergewinnungsversuch analysiert. Die auf Replikationseffizienz zu untersuchenden Plasmide enthalten jeweils das „family of repeats“ Element (FR) von dem latenten EBV-Replikationsursprung OriP, das zum Erhalt des Plasmids im Zellkern dient. Das „dyad symmetry“ Element (DS), welches das virale Replikationselement ist, wurde durch die zu untersuchenden Origin-Sequenzen ersetzt (schwarzer Balken). G4 Motive in den einzelnen Origin-Sequenzen sind in der schematischen Darstellung als rote Balken wiedergegeben (keine Maßstabgetreue Abbildung). 500 bp Fragmente von cc2 und cc4 Origin sind im schwarzen Rahmen gezeigt.

4.2.1. Der Plasmid-Wiedergewinnungsversuch

Für die Untersuchung der Replikationseffizienz und Rekrutierung von Replikationsproteinen an die G4-Motive wurde das OriP-basierte Plasmid-System verwendet. OriP ist der latente Replikationsursprung des Epstein-Barr Virus, der aus hauptsächlich zwei Sequenz-Elementen besteht, an die das virale Protein EBV-Nuclear-

Antigen 1 (EBNA1) bindet. Dazu gehört zum einen das „family of repeats“ Element (FR), das EBNA1-gebunden eine stabile Segregation der Plasmide während der Mitose sichert [100,106]. Zum anderen vermittelt das „dyad-symmetry“ Element (DS) zusammen mit EBNA1 die Replikationskompetenz [92-94] (Abb. 1.2).

Die Fähigkeit der ausgewählten Replikationsursprünge im OriP-Plasmid-System Replikation zu unterstützen wurde mit dem Plasmid-Wiedergewinnungsversuch untersucht (Abb. 4.17). Dazu wurden humane Nierenkarzinomzellen (HEK 293 Zellen), die EBNA1 exprimieren (EBNA1⁺-HEK293), mit den einzelnen Reporterplasmiden transfiziert und ohne Selektionsdruck für vier Tage inkubiert. Durch HIRT-Extraktion wurde die niedrigmolekulare Plasmid-DNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktion angereichert und nicht-replizierte und methylierte Plasmid-DNA durch *DpnI*-Verdau abgebaut. Elektrokompente DH10B Bakterienzellen wurden mit Plasmid-DNA transformiert. Unter der Annahme, dass jede sich gebildete Bakterienkolonie aus nur einem replizierten Plasmid hervorgeht, wurde aus der Gesamtanzahl der Kolonien die Replikationseffizienz ermittelt. Die Effizienz für jedes Plasmid wurde im Verhältnis zum Negativ-Referenzplasmid (delta-DS bzw. 4 x TetO) dargestellt.

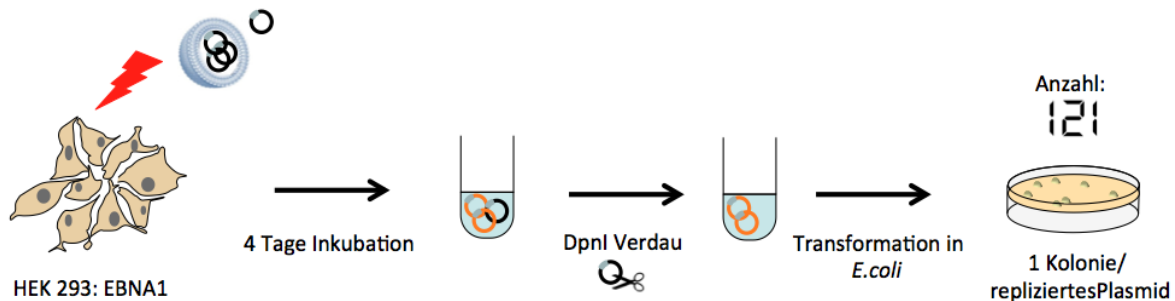


Abb. 4.17: Der Plasmid- Wiedergewinnungsversuch zur Bestimmung der Replikationseffizienz von (OriP-basierten) Plasmiden in humanen Zellen. EBNA1⁺-HEK293 Zellen wurden jeweils mit den zu untersuchenden Plasmiden transfiziert (schwarz). Die gesamte DNA wurde nach 4 Tagen post-Transfektion geerntet und die replizierte Plasmid-DNA (orange) nach DpnI Verdau isoliert. Nach Elektroporation elektrokompenter DH10B *E. coli* Zellen wurde die Kolonienzahl für jedes Plasmid ermittelt.

4.2.2. Generierung von Mutanten des cc2 500 Origins zur Untersuchung der Replikationseffizienz in Abhängigkeit der Länge, Orientierung und G4-Motiven

Wir generierten verschiedene Mutanten der cc2 500 Sequenz, um zu untersuchen inwiefern die Länge, die Orientierung der Sequenz im Plasmid und die G4-Motive eine Rolle in der Replikationseffizienz von cc2 500 spielen.

Um Effekte der Orientierung zu testen wurden Plasmide generiert, die 500 bp Fragmente von cc2 und cc4 Sequenzen in gerichteter und umgekehrter Orientierung enthalten (nur für cc2 500 in Abb. 4.18A dargestellt). Die 500 bp Sequenz des cc2 Origins hat nur zwei potenzielle G4-Motive. Hingegen hat die 500 bp Sequenz von cc4 neun G4-Motive. Daher ist die Analyse auf die Funktionalität und Wirkungsweise der G4-Motive unter Verwendung des cc2 500 einfacher. Die G4-Motive G4#1 und G4#2 liegen 124 bp voneinander entfernt auf dem gleichen DNA-Strang.

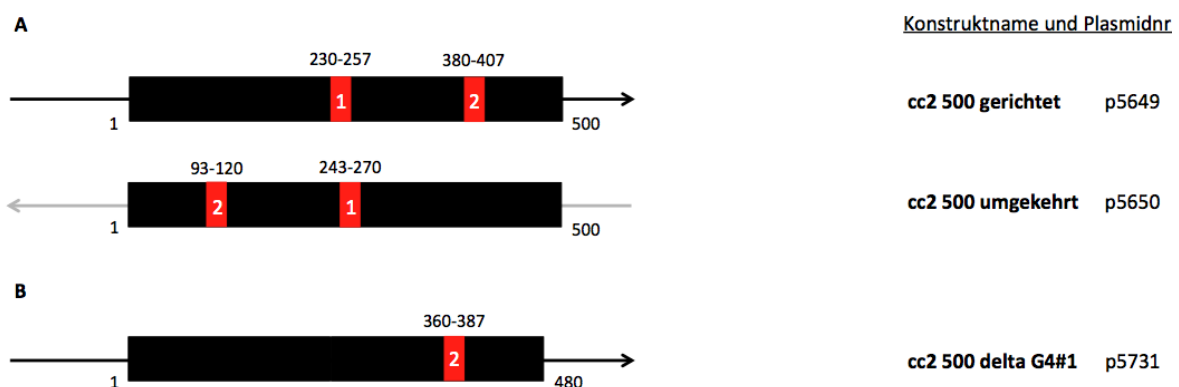
Die Bedeutung dieser Motive für die Replikationseffizienz des cc2 500 bp Replikationsursprungs wurde anhand einzelner G4#1- und G4#2-Mutanten und einer Kombination von Mutationen in beiden G4-Motiven näher untersucht. In Abbildung 4.18C sind die Sequenzen der generierten Mutanten von cc2 500 schematisch dargestellt. Die Mutationen im ersten und zweiten G4-Motiv sind für die einzelnen Mutanten aufgeführt. Zudem wurde der G-score für jedes G4-Motiv bioinformatisch über die „QGRS Mapper“ Software ermittelt [181]. Für die Funktionsanalyse generierten wir in Kooperation mit dem Méchali-Labor folgende Mutanten:

Um die Abhängigkeit vom ersten G4-Motiv zu untersuchen wurden zwei Konstrukte hergestellt. Erstens eine Deletionsmutante cc2 500 delta G4#1, in der die Sequenz des ersten G4-Motivs komplett fehlt (Abb. 4.18B). Zweitens eine Punktmutante cc2 500 G4#1 mut (1), in der das erste G4-Motiv durch 19 Nukleotidänderungen aufgehoben ist, jedoch die Länge der Sequenz erhalten bleibt (Abb. 4.18C). Zudem wurden Varianten von der cc2 500 Sequenz in gerichteter und umgekehrter Orientierung generiert, die beide G4-Motive enthalten, jedoch in denen flankierende Sequenzen um die G4-Motive entfernt wurden. Diese Varianten sind mit cc2 330 gerichtet bzw. umgekehrt beschrieben (Abb. 4.18D)

Um die Bedeutung des zweiten G4-Motivs für die Replikationsaktivität von cc2 500 zu untersuchen wurde eine Punktmutante generiert, in der nur das zweite G4-Motiv (G4#2) durch Austausch von zwei Nukleotiden aufgehoben ist (G-score 0). Die

Replikationskompetenz in Abhängigkeit beider G4-Motive wurde mit einer Doppelmutante, in der beide G4-Motive punktmutiert sind (cc2 500 G4#1 (2), G4#2 mut) betrachtet. Die Doppelmutante enthält eine andere Punktmutation für das erste G4-Motiv im Vergleich zu cc2 500 G4#1 (1) mut und die gleichen Basenpaaränderungen für das zweite G4-Motiv wie in cc2 500 G4#2 mut. In cc2 500 G4#1 mut (1) ist die Ausgangssequenz von G4#1 sehr stark verändert. Um möglichst nahe bei der Ausgangssequenz zu bleiben, haben wir eine weitere Mutante von G4#1 in der Doppelmutante generiert, in der 4 Basenänderungen das G4#1-Motiv fast vollständig aufheben (G4#1 mut (2)). Die Wahrscheinlichkeit eine G4-Struktur auszubilden ist in dieser Mutante erheblich reduziert (G-score wird von 38 auf 12 reduziert). Für die Generierung von cc2 500 G4#2 mut und cc2 500 G4#1 (2), G4#2 mut wurden bei der Firma Genescript Plasmide mit der mutierten Sequenz von cc2 500 bestellt. Über *AscI*-Verdau wurde die Sequenz in das delta-DS Plasmid eingefügt.

Um zu untersuchen, ob das mehrfache Auftreten von G4-Motiven einen Einfluss auf die Replikationseffizienz hat, wurden zusätzlich Dimere und Tetramere der cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 Sequenz generiert (Abb. 4.18E). Die Sequenzen haben Längen von ca. 1000 und 2000 bp. Für Dimer und Tetramer des cc2 500 resultieren 4 (2 x 2) bzw. 8 (4 x 2) G4-Motive von G4#1 und G4#2 innerhalb der einzelnen Sequenz. Für die des cc2 500 delta G4#1 resultieren 2 (2 x 1) bzw. 4 (4 x 1) G4-Motive von G4#1.



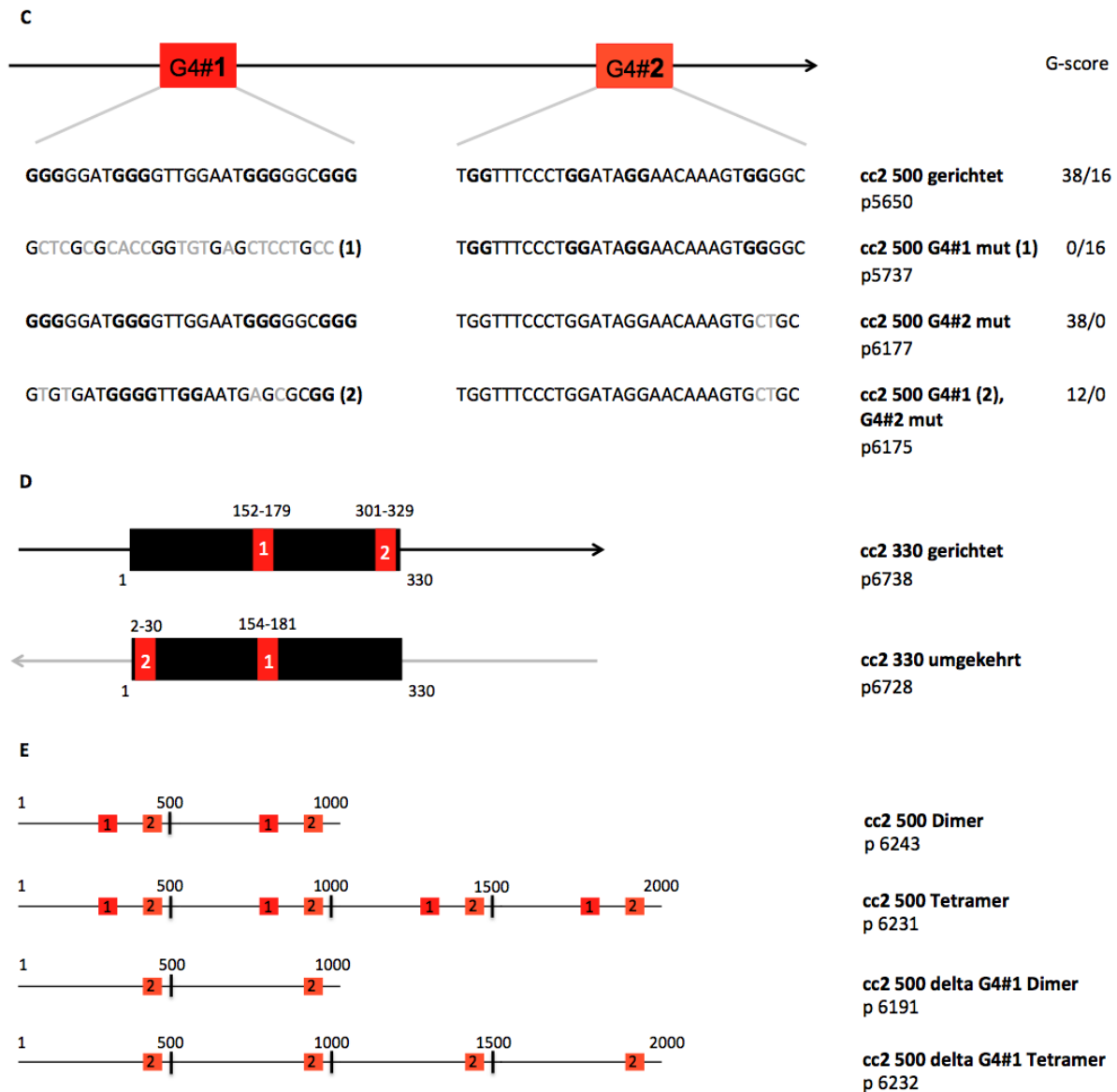


Abb. 4.18: Im Plasmid- Wiedergewinnungsversuch analysierte Mutanten des Maus cc2 500 Origins. (A) Schematische Darstellung der cc2 500 bp und cc2 330 bp Sequenz mit erstem und zweitem G4-Motiv (G4#1 bzw. G4#2) in beiden Orientierungen. Zahlen geben die Position des G4-Motivs im 500 bp Fragment an. **(B)** Deletionsmutante von cc2 500, in der G4#1 fehlt. **(C)** Punktmutanten von cc2 500. Die Sequenzen von G4#1 und G4#2 in den verschiedenen Konstrukten sind angegeben. Die G-Nukleotide, die zum G4 Motiv beisteuern sind fett gedruckt. Mutierte Nukleotide, die das G4-Motiv schwächen bzw. aufheben sind grau dargestellt. Angegeben ist zusätzlich der G-score des jeweiligen G4-Motivs (G4-Motive und G-score wurden ermittelt über die „QGRS Mapper“ Software [181]). **(D)** schematische Darstellung der cc2 330 bp Sequenz mit erstem und zweitem G4-Motiv (G4#1 bzw. G4#2) in jeweils gerichteter und umgekehrter Orientierung im Plasmid. Zahlen geben die Position der G4-Motive im 330 bp Fragment an. **(E)** Multimere von cc2 500 und cc2 500 G4#1 mut. Jeweils Dimere und Tetramere wurden von beiden Varianten generiert. Rote Quadrate stellen die G4-Motive dar. Zahlen geben die Länge der Konstrukte in Abschnitten der 500 bp Sequenz an.

4.2.3. Die Replikationseffizienz von cc2 und cc4 Origins hängt von der Länge und der Orientierung des Origins im Plasmid ab

Zunächst wurde untersucht, ob die Länge und Orientierung der Origin-Sequenzen von cc2 und cc4 im Plasmid eine Rolle spielen. Im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch ist die Replikationseffizienz dieser Sequenzen relativ zu der des delta-DS-Plasmids ausgedrückt. OriP zeigt eine 3,5-fach höhere Replikationsaktivität gegenüber der Aktivität von delta-DS (Abb. 4.19A). Der c-Myc-Origin zeigt ebenfalls Replikationsaktivität von 1,5-fach über delta-DS. Für die ca. 2 kb langen Sequenzen von cc2- und cc4 Origin hingegen wird keine Replikationsaktivität im Plasmid-System beobachtet. Interessanterweise replizieren die 500 bp Fragmente von cc2 und cc4 2,5- bzw. 1,5-fach über dem Niveau des delta-DS-Plasmids. Somit liegt die cc4 500 Sequenz auf dem Niveau von c-Myc, eines der effizientesten genomischen Origins im Plasmid-System. Das cc2 500 Fragment repliziert um das 1,5-fache mehr, als der c-Myc Origin, was auf einen sehr effizienten Origin hindeutet. Die Replikationseffizienzen der 500 bp Sequenzen von cc2 und cc4 in umgekehrter Orientierung erreichen hingegen das Niveau des delta-DS-Plasmids und sind signifikant niedriger im Vergleich zu denen der gerichteten Sequenzen (Abb. 4.19). Für den cc4 Origin sind die Mittelwerte auf zwei stabile Experimente zurückzuführen.

Die 330 bp Fragmente des cc2 Origins in gerichteter und umgekehrter Orientierung zeigen eine gleichstarke sehr signifikante Abnahme der Effizienz bis auf das Niveau des delta-DS Plasmids (Abb. 4.20A). Hier wird keine Orientierungsabhängigkeit beobachtet. Dies weist darauf hin, dass in diesem Fall das Fehlen weiterer Replikations-unterstützender Elemente für die Abnahme der Replikationsaktivität verantwortlich ist.

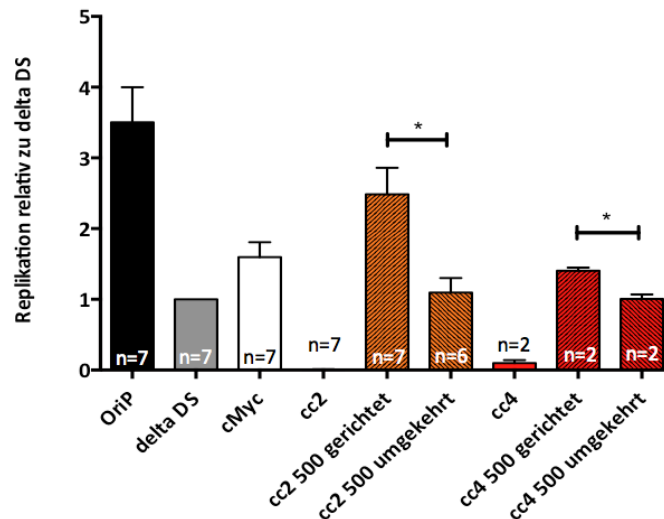


Abb. 4.19: Die Replikationseffizienz von cc2 und cc4 Sequenzen in Abhängigkeit von Länge und Orientierung. Untersucht wurde die Replikationseffizienz der Maus cc2 und cc4 Sequenzen sowie 500 bp Fragmente dieser Origins im Plasmid-System in EBNA1⁺-HEK293 Zellen. Das OriP-Plasmid diente als Positiv-Referenzplasmid, das delta-DS Plasmid als Negativ-Referenzplasmid. Der c- Myc Origin wurde als Replikationskontrolle für einen humanen Replikationsursprung mitgeführt. Nach Durchführung des Plasmid- Wiedergewinnungsversuchs wurde die Replikationseffizienz für jedes Plasmid über das Verhältnis der Anzahl der gebildeten Kolonien zu der Negativkontrolle (delta-DS) ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte mit und der Standardfehler (n=2-7). Replikationseffizienzen von cc2 und cc4 Origin sowie der 500 bp langen Fragmenten in jeweils gerichteter und umgekehrter Orientierung im Plasmid. Die statistische Analyse unter Verwendung des doppelten unabhängigen *t*-Tests (Prism) ergab einen *p*-Wert von 0,0104 und 0,0369 für cc2 500 bzw. cc4 500 gerichteter zu ungerichteter Sequenz, welches mit * gekennzeichnet ist.

Zusammenfassend wird eine Längen- und Orientierungsabhängigkeit für die Replikationsaktivität von cc2 und cc4 Origins im Plasmid-System beobachtet. Dieses Ergebnis deutet auf eine Abhängigkeit der G4-Motive zu einem weiteren regulierenden Element – bei Valton et al., (2014) als *cis*-Modul bezeichnet, hin.

4.2.4. Eine kooperative Wechselwirkung der G4-Motive bewirkt die effiziente Replikation des cc2 500 Origins

Das cc2 500 bp Fragment enthält zwei G4-Motive. Deshalb wollten wir den Beitrag der G4-Motive zur Replikationsaktivität anhand dieses Fragments untersuchen. Dazu wurden die einzelnen G4-Mutanten der cc2 500 Sequenz im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch auf Replikationskompetenz bzgl. der G4-Motive untersucht. Zunächst wurden die Einzel-Mutanten von G4#1 und die 330bp-Fragmente getestet. Die Effizienz wurde relativ zu der des delta-DS-Plasmids

ausgedrückt. Für alle G4-Mutanten wird eine starke Abnahme der Replikationseffizienz beobachtet. Verglichen mit der 2,5-fachen Aktivität von cc2 500 bp relativ zu delta-DS, sinkt für cc2 500 G4#1 (1) mut die Effizienz signifikant auf das Niveau des delta-DS-Plasmids ab (Abb. 4.20A). Die Replikationseffizienzen von cc2 500 delta G4#1 und von cc2 330 bp Varianten nehmen ebenfalls sehr signifikant bis unter das Niveau des delta-DS-Plasmids ab (Abb. 4.20A). Dieses Ergebnis zeigt, dass das erste G4-Motiv einen zentralen Beitrag zur Replikationseffizienz von cc2 500 leistet. Eine vergleichbare Abnahme der Replikationseffizienz wird für cc2 330 in gerichteter wie in umgekehrter Orientierung beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass G4#1 nicht das einzige Motiv ist, das für die Effizienz von cc2 500 eine Rolle spielt. Vielmehr weist das Ergebnis auf ein weiteres regulierendes Element für die Replikationsfunktion hin.

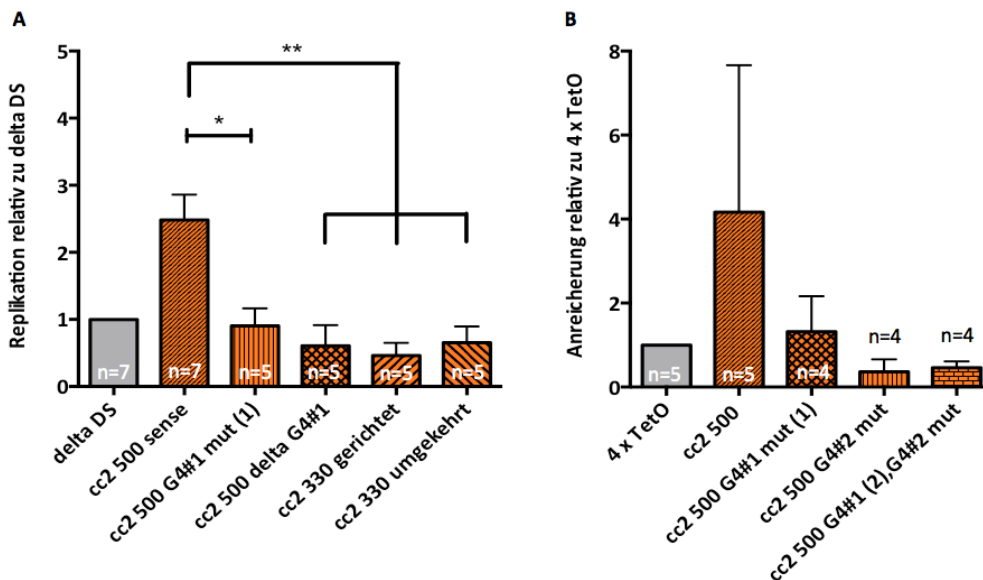


Abb. 4.20: Die Replikationseffizienz von cc2 und cc4 Sequenzen in Abhängigkeit der G4-Motive.

Untersucht wurde die Replikationseffizienz der Mutanten des cc2 500 bp Fragments im Plasmid-System in EBNA1⁺-HEK293 Zellen. Das OriP-Plasmid diente als Positiv-Referenzplasmid, das delta-DS Plasmid bzw. 4 x TetO als Negativ-Referenzplasmid. Nach Durchführung des Plasmid-Wiedergewinnungsversuchs wurde die Replikationseffizienz für jedes Plasmid über das Verhältnis der Anzahl der gebildeten Kolonien zu der Negativkontrolle (delta-DS, 4 x TetO) ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=4-7). **(A)** Replikationseffizienz von G4#1-Mutanten des cc2 500 Origins. Das G4#1 Motiv wurde durch Punktmutationen verändert oder deletiert. Replikationseffizienz von 330 bp langen Fragmente des cc2 Origins in gerichteter sowie umgekehrter Orientierung mit beiden G4-Motiven. Die statistische Analyse unter Verwendung des doppelten unabhängigen *t*-Tests (Prism) ergab einen *p*-Wert von 0,0102 (*) bzw. 0,0047, 0,0017 und 0,0041 (**). **(B)** Replikationseffizienzen von cc2 500, G4#1- und G4#2-Punktmutanten, sowie der G4#1,G4#2 Doppelmutante.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise der G4-Motive auf die Replikationskompetenz von cc2 500 allein und im Zusammenspiel miteinander untersucht.

Obwohl die Plasmide mit cc2 und cc4 Origins mehrfach höhere Replikationsaktivität zeigten als das delta-DS-Plasmid, haben die Ergebnisse auch gezeigt dass delta-DS einen Hintergrund an Replikationsaktivität zeigt. Aufgrund der Replikationsaktivität des delta-DS-Plasmids wurde in den folgenden Experimenten dieses durch das 4 x TetO Plasmid (p3315) ersetzt. Bei letzterem sind anstelle des DS-Elements vier Tetrazyklin-Operator-Sequenzen eingefügt, die in EBNA1⁺-HEK293 Zellen keine Replikation fördern [118].

Für die Analyse wurden die einzelnen G4#1- und G4#2-Punktmutanten, sowie die G4-Doppelmutante im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch untersucht (Abb. 4.18C). Eine Abnahme der Effizienz wird für beide Einzel-Mutationen von G4#1 und G4#2 beobachtet. Für die cc2 500 Sequenz wurde eine ca. 4-fache Anreicherung gegenüber dem 4 x TetO-Plasmid beobachtet (Abb. 4.20B). Während das Niveau für die G4#1-Mutante bis auf das 1,5-fache absinkt, erreicht das Niveau von der G4#2-Mutante dasjenige des 4 x TetO-Plasmids (Abb. 4.20B). Es wird ersichtlich, dass beide G4-Motive eine zentrale Rolle für die Replikationseffizienz spielen. Das zweite G4-Motiv ist wesentlich an der Replikationsfunktion beteiligt, da die zusätzliche Mutation in G4#1 der G4-Doppelmutante nicht das Niveau der G4#2-Mutante unterschreitet. Cc2 500 G4#1 mut (1) zeigt jedoch auch, dass die Präsenz von G4#2 alleine nicht die volle Replikationseffizienz von cc2 500 bp wiederherstellt. Die hier beschriebenen Ergebnisse der Plasmid-Wiedergewinnungsexperimente führen zu der These, dass für die effiziente Replikation von cc2 500 bp beide G4-Motive kooperativ wechselwirken.

4.2.5. Eine Multimerisierung von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 steigert nicht deren Replikationseffizienz

Frühere Studien zum Replikationsursprungs Or6 im OriP-Plasmid-System haben gezeigt dass durch Multimerisierung der Sequenz des Origins eine Effizienzsteigerung der Replikation erzielt wird [110]. Durch Multimerisierung eines schwachen Motivs wurde das Replikationspotential der Sequenz erhöht. Uns hat

interessiert ob die Multimerisierung eines G4-Motiv-enhaltenden Origins auch in einer Effizienzsteigerung resultiert. Als Vergleich diene das Replikationsniveau des viralen Replikationsurspungs OriP von EBV. Die Frage wurde anhand einer Multimerisierung der cc2 500 Sequenz untersucht. Außerdem wurde mit einer Multimerisierung der cc2 500 delta G4#1 Sequenz analysiert, ob weitere Motive von G4#2 die Replikation wieder induzieren.

Für den Versuch wurden Plasmide mit Monomer-, Dimer- und Tetramer-Sequenzen von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 (Abb. 4.18E) im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch analysiert und die Replikationseffizienz relativ zu der des 4 x TetO Plasmids dargestellt. Während jeweils das Monomer und Dimer von cc2 500 bp bzw. cc2 500 delta G4#1 eine tendenzielle Abnahme der Replikationseffizienz im Plasmid-System zeigen, wird für die einzelnen Tetramere eine Effizienz auf dem Niveau von 4 x TetO erhalten (Abb. 4.21). Daraus ist ersichtlich, dass im Plasmid-System weder für cc2 500 bp noch für cc2 500 bp delta G4#1 eine Steigerung der Replikationseffizienz durch Multimerisierung der Sequenz erzielt wird. Eine Erhöhung der Anzahl an G4-Motiven steigert nicht *per se* die Replikationseffizienz im Plasmid-System. Vielmehr weist die Abnahme der Replikationseffizienz bei Multimerisierung von cc2 500 darauf hin, dass entweder die zusätzlichen G4-Motive Replikations-inhibierend wirken oder das OriP-basierte Plasmid- System bzgl. der Länge des zu untersuchenden Fragments limitiert ist.

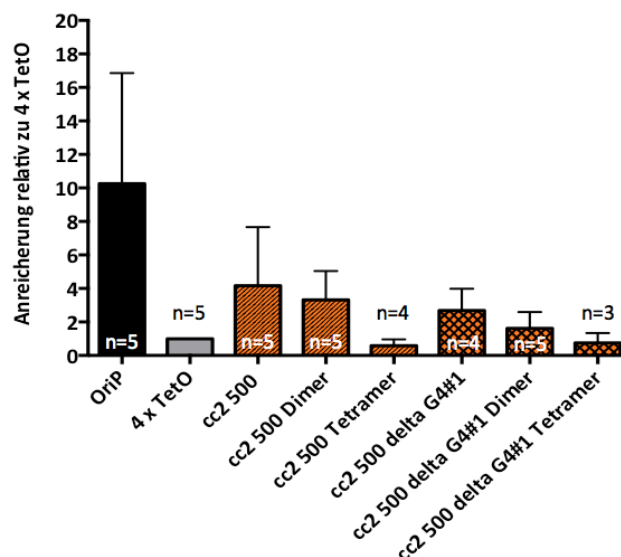


Abb. 4.21: Eine Multimerisierung steigert nicht die Replikationseffizienz von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 Sequenzen. Untersucht wurde die Replikationseffizienz von Dimer- und Tetramer-Sequenzen von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1 im Plasmid-System in EBNA1⁺-HEK293 Zellen. Das OriP-Plasmid diene als Positiv-Referenzplasmid, das 4 x TetO als Negativ-Referenzplasmid. Nach Durchführung des Plasmid- Wiedergewinnungsversuchs wurde die Replikationseffizienz für jedes

Plasmid über das Verhältnis der Anzahl der gebildeten Kolonien zu der Negativkontrolle (4 x TetO) ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n=3-5).

Zusammenfassend zeigen die Plasmid-Wiedergewinnungsexperimente mit den Replikationsursprüngen aus Maus cc2 und cc4, dass im Plasmid-System die Länge, die Orientierung der Sequenz im Plasmid und die G4-Motive eine entscheidende Rolle für eine effiziente Replikation spielen. Außerdem wurde anhand der Mutationsanalysen der G4-Motive G4#1 und G4#2 des cc2 500 Origins deutlich, dass diese Motive dessen Replikation in kooperativer Weise beeinflussen können. Aus den Ergebnissen mit den 330 bp Fragmenten von cc2 ist jedoch ersichtlich, dass es ein weiteres Element geben muss, dass die Replikationseffizienz im Zusammenspiel mit den G4-Motiven bestimmt. Eine Multimerisierung der Sequenz zeigte keine Replikationssteigerung von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1, sondern führte zu einer Abnahme der Effizienz.

4.2.6. Proteine der Replikationsmaschinerie binden nicht spezifisch an die G4-Motive des cc2 500 Origin

Für OriP ist bekannt, dass EBNA1 an DS bindet und über seine N-terminale Domäne ORC rekrutiert, welches zur OriP-vermittelten Replikation führt [89-91,117,185]. Im Fall von cc2 500 ist die Replikationseffizienz unter anderem von den G4-Motiven abhängig. Jedoch ist bisher nicht geklärt welche Mechanismen für die ORC-Rekrutierung im Kontext mit G4-Motiven zu Grunde liegen. Hoshina et al, (2013) zeigen in *in vitro* Studien, dass die Orc1 Untereinheit bevorzugt an RNA und ssDNA bindet, die G4-Motive enthält. Dies ist ein Hinweis dafür, dass unter anderem ORC G4-abhängig Replikationsursprünge erkennt und durch Bindung bzw. Rekrutierung diese als potentiellen Origin markiert. Es ist aber nicht klar ob *in vivo* das tatsächlich der Fall ist. Nach dieser Theorie würde man ORC Untereinheiten an G4-Motiven assoziiert vorfinden. Um dies zu testen, wurde die Assoziation von Orc2 und Mcm3 Proteinen an die G4-Motive von cc2 500 Origin anhand von Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Analysen getestet. Dafür wurden die OriP-basierten Plasmide, in denen die DS Sequenz durch diejenige von cc2 500 bp und cc2 500 delta G4#1 ersetzt wurde, verwendet. Wie für den Plasmid-

Wiedergewinnungsversuch wurden EBNA1⁺-HEK293 Zellen mit den einzelnen Plasmiden transfiziert. Es wurden zunächst Kurzzeit-Experimente für die ChIP-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen für 4 Tage nach Transfektion ohne Selektionsdruck inkubiert. Protein-DNA Wechselwirkungen wurden mit 1 % Formaldehyd in den Zellen fixiert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und der Chromatin-Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen Orc2 und Mcm3 unterzogen. Eine Kontrolle mit Präimmunserum (IgG-Kontrolle) wurde für die Bestimmung der Hintergrund-Bindung der Proteine an die Beads bzw. Antikörper mitgeführt. Vor der Immunpräzipitation (IP) wurden 10 % des Chromatins als Input-Probe für die später folgende Auswertung der Anreicherung in % Input aufbewahrt. Nach der IP wurden die DNA-Fragmente, die an die Orc2 und Mcm3 Proteine gebunden waren, durch Proteinase K Verdau und Revertierung der kovalenten Bindung zwischen Protein und DNA isoliert. Nach dem RNase Verdau wurde die DNA über eine Silica-Membran (NukleoSpin®) gereinigt. Spezifische Primer-Paare (Tab. 2.9) wurden in der quantitativen PCR verwendet, um die Anreicherung von Orc2 und Mcm3 an DS und an den beiden G4-Motiven G4#1 und G4#2 zu detektieren (Abb. 4.22A). Als Negativ-Lokus dienten FR als virales Element und der Ampizillin-Lokus (Amp) als unspezifische Plasmid-Sequenz. Außerdem wurde das OriP-enhaltende Plasmid als Positiv-Referenzplasmid für die Anreicherung von Orc2 und Mcm3 am DS-Element mitgeführt. Das Plasmid welches anstelle der DS-Sequenz 4 x TetO enthält diente als Negativ-Referenzplasmid.

Im Folgenden ist die Anreicherung von Orc2 und Mcm3 einerseits relativ zu der Anreicherung der IgG-Kontrolle und andererseits in % Input angegeben (Abb. 4.22B und C). Mit beiden Darstellungen wurden in den Kurzzeit-Experimenten für das OriP-Plasmid an DS keine Anreicherung von Orc2 und Mcm3 erhalten. Die Höhe der Anreicherung von Orc2 und Mcm3 an DS, FR und dem Amp-Lokus liegt mit ca. 5-fach gegenüber IgG bzw. mit 0,02-0,03 % Input auf dem Niveau des Negativ-Referenzplasmids 4 x TetO. Somit hat die Positivkontrolle von Orc2 und Mcm3 an DS unter den Bedingungen der Kurzzeit-Experimente nicht funktioniert. Auch für die G4-Motive G4#1 und G4#2 in cc2 500 wurde keine Anreicherung für Orc2 und Mcm3 bzgl. des Amp-Lokus detektiert. Relativ zur IgG-Kontrolle wurde jedoch eine ca. 10-fache Anreicherung von Orc2 an G4#2 in cc2 500 delta G4#1 beobachtet, die jedoch in % Input gesehen auf dem Niveau des Amp-Lokus liegt. Aus den Ergebnissen der Kurzzeit-Experimente kann keine zuverlässige Aussage über die Anreicherung von

Orc2 und Mcm3 an die G4-Motive getroffen werden, da die Anreicherung von Orc2- und Mcm3 an DS als Positivkontrolle nicht funktioniert hat und es zu Abweichungen zwischen den einzelnen Experimenten kam. Daraus wird die Schlussfolgerung getroffen, dass die Kurzzeit-Experimente der ChIP unter diesen Bedingungen zu keinen stabilen Ergebnissen führen.

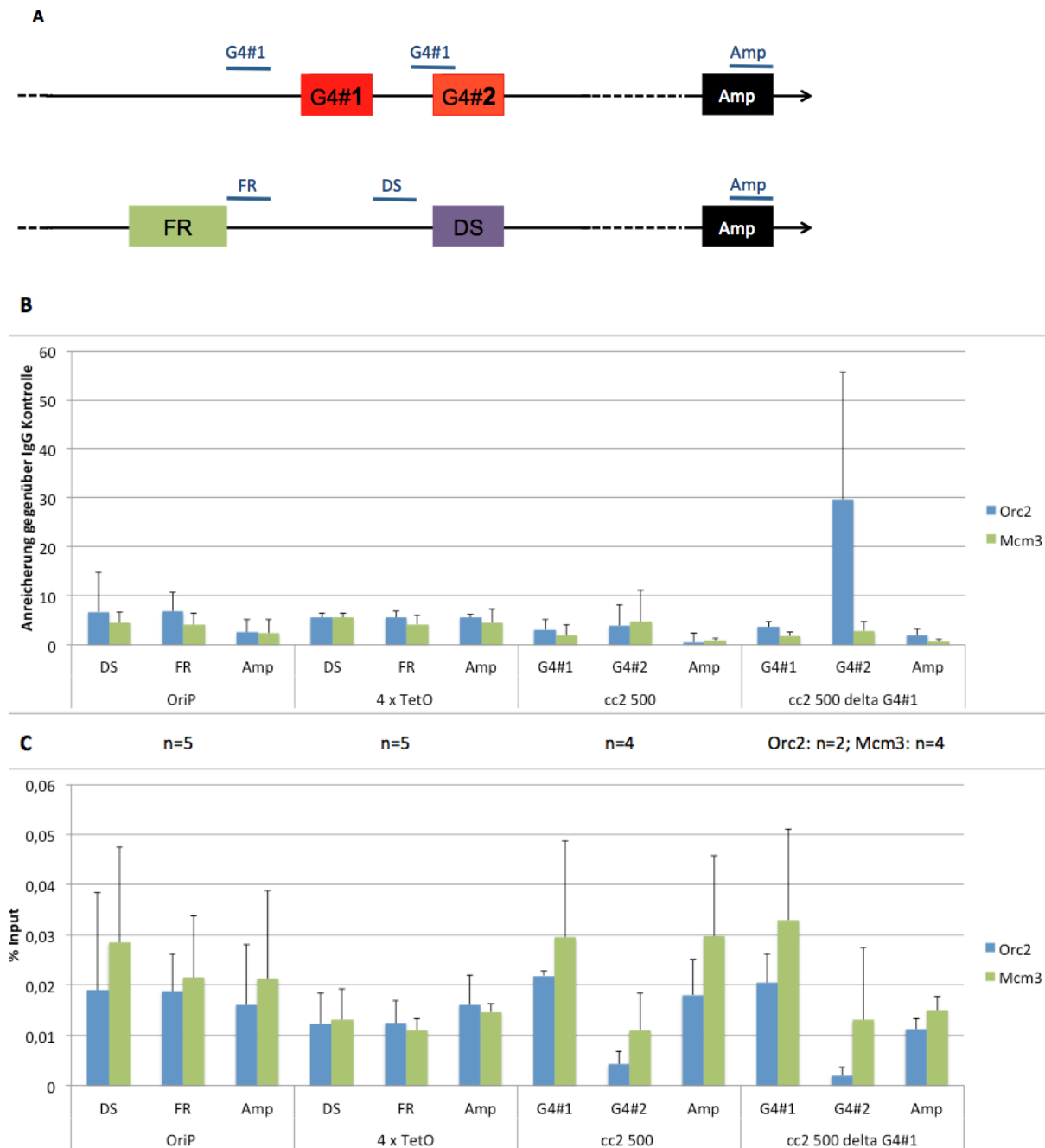


Abb. 4.22: ChIP-Analysen von Orc2 und Mcm3 Proteine an die G-Quadruplex (G4) Motive der cc2 500 Sequenz in Kurzzeit-Experimenten. EBNA1-exprimierende HEK 293 Zellen wurden jeweils mit Plasmiden transfiziert, die anstelle des viralen Replikationselements DS von OriP die jeweils zu untersuchende cc2 500 bp Sequenz enthielten. Das OriP-Plasmid diente hier als Positiv-Referenzplasmid für die Assoziation von Orc2 und Mcm3 an DS, das 4 x TetO Plasmid als

Negativkontrolle. Gezeigt sind die Ergebnisse nach 4 Tagen Post-Transfektion der Zellen, nach der Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Orc2 und Mcm3 sowie mit einer IgG Kontrolle. **(A)** Schematische Darstellung von cc2 500 sowie OriP-Sequenz und Bindestellen, der für die qPCR verwendeten Primer. Elemente, die auf Orc2 und Mcm3 Bindung untersucht wurden: „dyad symmetry“ Element (DS), das erste und zweite G4 Motiv in der cc2 500 Sequenz (G4#1 und G4#2). Das „family of repeats“ Element (FR) und der Ampizillin-Lokus (Amp) dienten als Negativ-Kontrollregion **(B)** Assoziation von Orc2 und Mcm3 Proteinen an die G4-Motive (G4#1, G4#2) von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1. Die präzipitierte DNA wurde in der quantitativen PCR (qPCR) analysiert und die Anreicherung der spezifisch präzipitierten DNA relativ zu der aus der IgG Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n=2-5) **(C)** Darstellung in % Input. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n= 2-5).

Ein möglicher Grund ist, dass nach vier Tagen Inkubation der Zellen zwar genügend Plasmide repliziert wurden jedoch die Ausbildung des Chromatins zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig etabliert ist. Die Chromatinumgebung spielt jedoch eine entscheidende Rolle für die Etablierung von Origins und die Rekrutierung von ORC [193]. Aufgrund dessen wurden ChIP-Analysen von transfizierten Zellen durchgeführt, welche 14 Tage unter Selektionsdruck gewachsen waren. Mit der Annahme, dass die Plasmide sich unter diesen Bedingungen über mehrere Zellzyklen in den Zellen etablieren, steht erstens durch die Anreicherung der Plasmide durch Selektion mehr Ausgangsmaterial für die ChIP-Analyse zur Verfügung und zweitens haben sich möglicherweise mehr Pre-Replikationskomplexe stabil auf dem Plasmid etabliert. Diese Eigenschaften können zu zuverlässigeren Aussagen in der ChIP-Analyse führen.

Auch für die Langzeit-Experimente wurden die OriP-basierten Plasmide, in denen die DS Sequenz durch diejenige von cc2 500 bp und cc2 500 delta G4#1 ersetzt wurde, verwendet und die Anreicherung relativ zu derjenigen in der IgG-Kontrolle und in % Input angegeben (Abb. 4.23).

Es wurde eine ca. 17-fache Anreicherung von Orc2 und Mcm3 an DS relativ zur IgG-Kontrolle beobachtet. Diese ist ca. dreimal höher, als für die Referenz-Loci FR und Amp im gleichen Plasmid und ca. 3- bis 8-fach höher wie für DS, FR und Amp im 4 x TetO Negativ-Referenzplasmid (Abb. 4.23A). Gleiche Tendenz zeigte sich auch in der Darstellung der Anreicherung in % Input (Abb. 4.23B). Dies zeigt, dass mit den Langzeit-Experimenten eine stabile spezifische Assoziation von Orc2 und Mcm3 an DS etabliert wird, die über ChIP zuverlässig detektiert wird. Für cc2 500 hingegen wird keine spezifische Anreicherung von Orc2 und Mcm3 an die G4-Motive im Vergleich zum Amp-Lokus detektiert. Die Anreicherung erreicht ein Niveau vergleichbar mit dem an DS von 4 x TetO. Das gleiche Ergebnis wurde auch für cc2 500 delta G4#1 erhalten, in dem das erste G4-Motiv deletiert ist.

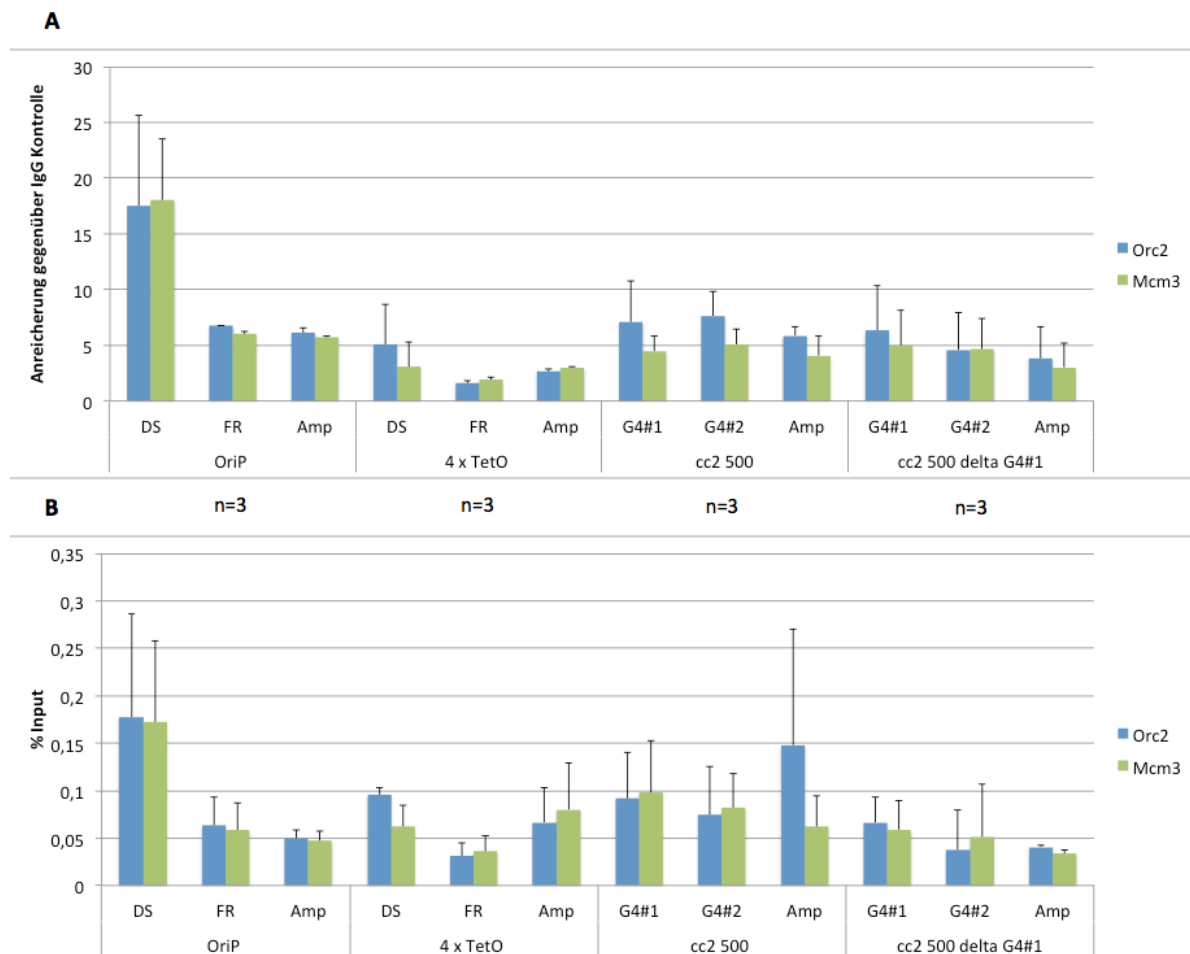


Abb. 4.23: ChIP-Analysen von Orc2 und Mcm3 Proteinen an die G-Quadruplex (G4) Motive des cc2 500 Sequenz in Langzeit-Experimenten. EBNA1-exprimierende HEK 293 Zellen wurden jeweils mit Plasmiden transfiziert, die anstelle des viralen Replikationselements DS von OriP die jeweils zu untersuchende cc2 500 bp Sequenz enthielten. Das OriP-Plasmid diente hier als Positiv-Referenzplasmid für die Assoziation von Orc2 und Mcm3 an DS, das 4 x TetO Plasmid als Negativkontrolle. Gezeigt sind die Ergebnisse nach 14 Tagen Post-Transfektion der Zellen, nach der Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Orc2 und Mcm3 sowie mit einer IgG Kontrolle. Die präzipitierte DNA wurde in der quantitativen PCR (qPCR) analysiert. Die Anreicherung der spezifisch präzipitierten DNA ist in % zur Input DNA dargestellt. Elemente, die auf Orc2 und Mcm3 Bindung untersucht wurden: „dyad symmetry“ Element (DS), das erste und zweite G4 Motiv in der cc2 500 Sequenz (G4#1 und G4#2). Das „family of repeats“ Element (FR) und der Ampizillin-Lokus (Amp) dienten als Negativ-Kontrollregion (A) Assoziation von Orc2 und Mcm3 Proteinen an die G4-Motive (G4#1, G4#2) von cc2 500 und cc2 500 delta G4#1. Die präzipitierte DNA wurde in der quantitativen PCR (qPCR) analysiert und die Anreicherung der spezifisch präzipitierten DNA relativ zu der aus der IgG Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (B) Darstellung in % Input. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n=3).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine zuverlässige Anreicherung von Orc2 und Mcm3 an DS als Positivkontrolle in den Langzeit-Experimenten erreicht wird. Jedoch wird keine Assoziation von diesen Proteinen an die G4-Motive des cc2 500 im Plasmid-System detektiert.

Im Hinblick auf die Ergebnisse des Plasmid-Wiedergewinnungsversuchs haben die G4-Motive des cc2 500 eine entscheidende Funktion für die Replikationseffizienz.

Allerdings wird eine Assoziation von Replikationsproteinen an die G4-Motive anhand von ChIP-Analysen nicht bestätigt und wird für die Effizienz des cc2 500 nicht in Verbindung gebracht.

5. Diskussion

DNA Replikationsursprünge werden als genomische Bereiche definiert, an denen die Replikation startet. Um Replikation zu initiieren bedarf es erstens der Bildung des prä-Replikationskomplex (pre-RC) und zweitens dessen Aktivierung durch die Rekrutierung der DNA-Polymerase und der Initiation der Replikation. Die Bildung des pre-RC beginnt mit der Bindung des Origin-Erkennungs-Komplex (ORC) an die Replikationsursprünge.

Welche Faktoren für die Rekrutierung von ORC an die Origins eine Rolle spielen ist in höheren Eukaryonten aufgrund der Komplexität des Genoms sehr flexibel. Zum einen tendiert die Lokalisation von Origins in höheren Eukaryonten zu GC-reichen Bereichen wie CpG-Islands [11,60,63,194,195]. Zum anderen ist die Chromatinumgebung, Kernstruktur und die Verknüpfung mit dem Prozess der Transkription ausschlaggebend [23].

Mithilfe der „High-Throughput“ Sequenzierung von „Short-Nascent-Strands“ ist es möglich geworden, Daten aus der Analyse von aktiven Origins mit Eigenschaften der DNA-Sequenz und epigenetischen Faktoren zu korrelieren. Dabei wurde das Potential der Ausbildung von G4-Strukturen der GC-reichen Bereiche mit Origin-Aktivität in Verbindung gebracht [11,63]. Eine Vermutung in diesem Zusammenhang ist, dass G4-Strukturen die Replikationseffizienz von Origins regulieren und potentielle Interaktionspartner für ORC darstellen [12,68,182].

(G4)-Strukturen sind helikale dreidimensionale Konformation von Nukleinsäuren, die potentiell in Guanin-reichen Regionen des Genoms gebildet werden. Sowohl auf DNA und RNA-Ebene werden G4-Strukturen mit der Regulierung von zellulären Prozessen korreliert [151,196,197].

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von G4-Strukturen für die Origin-Selektion und -Aktivität auf DNA-, sowie auf RNA-Ebene erforscht. Dafür wurde auf der einen Seite anhand eines ausgewählten Origins der Einfluss der G4-Strukturen auf die Replikationseffizienz und auf die pre-RC Bildung analysiert. Auf der anderen Seite wurde die Rolle von potentiellen RNA G4-Strukturen in der Interaktion zwischen ORC mit EBNA1, einem viralen ORC-Chaperon des Epstein-Barr Virus, näher untersucht.

5.1. Die ORC-Chaperon Interaktion

5.1.1. Die Rolle von RNA G4-Strukturen in der ORC-Rekrutierung an DS

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der G4-Motive auf die EBNA1-ORC Interaktion und die Assemblierung des pre-RC an DS in Raji-Zellen untersucht. Dazu wurden Raji-Zellen mit dem G4-bindenden Molekül TmPyP4 behandelt, das *in vitro* die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC inhibiert [166]. Mit der Behandlung von Raji-Zellen mit 5 und 10 μM TmPyP4 zeigen diese nach drei Tagen ein Proliferationsarrest und eine tendenzielle Verlängerung der S-Phase. ChIP-Analysen von EBNA1 und der pre-RC Proteine Mcm3 und Orc2 zeigen keine Veränderung hinsichtlich ihrer Assoziation an DS unter 10 μM TmPyP4. Die Ergebnisse der ChIP Experimente sind im Einklang mit der qPCR Analyse, die zeigt, dass die relative Anzahl von EBV-Genomen in Raji-Zellen durch TmPyP4 Behandlung nicht beeinflusst wird.

Raji-Zellen zeigen unter TmPyP4 ein verlangsamtes Wachstum und eine tendenzielle Verlängerung der S-Phase, welche auf die in der Literatur beschriebenen Effekte von TmPyP4 in Tumorzellen zurückgeführt werden können [173-176].

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen nicht mit einem Bericht von Norseen et al., (2009) überein, der eine Reduktion der relativen EBV-Kopienzahl von Raji-Zellen mit dem G4-bindenden Molekül BRACO19 beschreibt. Die Autoren stellen zudem eine Inhibition der Replikationsfunktion des EBNA1/OriP-Plasmid-Systems durch BRACO19 fest. Immunfluoreszenz Studien zeigen weiterhin, dass BRACO19 die Assoziation von EBNA1 mit den Metaphasen-Chromosomen aufhebt [166].

Gegenüber DNA G4-Strukturen zeigen BRACO19 und TmPyP4 unterschiedliche Interaktionseigenschaften. BRACO19 basiert auf einer Acridin-Struktur (Abb. 5.1A). und kann gleichzeitig mit drei Furchen der G-Quadruplex Struktur aufgrund seiner trigonalen Struktur interagieren [198]. TmPyP4 gehört zur Molekülklasse der tetra-kationischen Porphyrine (Abb. 5.1B). Wie TmPyP4 mit der G4-Struktur interagiert ist kontrovers diskutiert. Strukturanalysen zeigen neben der Möglichkeit einer Interkalation von TmPyP4 zwischen die G4-Tetraden auch eine Bindung von TmPyP4 oberhalb der G4-Struktur [173,199]. Zudem wird eine Interaktion mit den

Nukleotiden der „Loop“-Sequenz außerhalb der G4-Struktur beobachtet, ohne direkten Kontakt von TmPyP4 zum G4-Stapel [200].

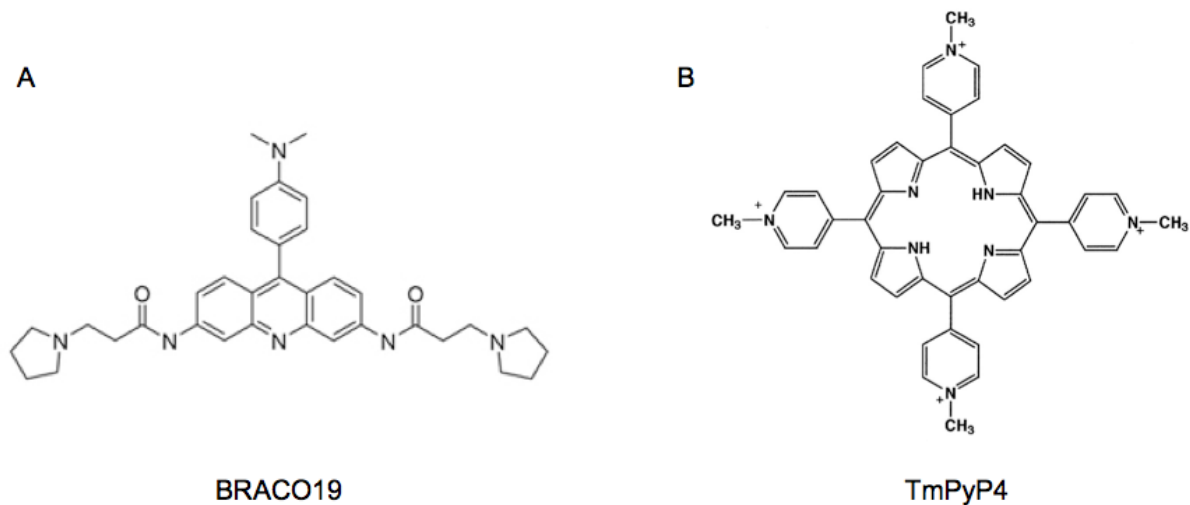


Abb. 5.1: G4-bindende Moleküle. (A) BRACO19 basiert auf einer Acridin-Struktur. **(B)** TmPyP4 gehört zu den tetra-kationischen Porphyrinen. Abb. entnommen aus [178].

Es gibt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten für die Diskrepanz dieser Arbeit und dem Bericht von Norseen et al., (2009), die im Folgenden diskutiert werden.

Norseen et al., (2009) führen eine Abnahme der EBV-Genome in EBV-positiven Zellen unter BRACO19 entweder auf eine Inhibition der Chromosomen-Assoziation und/oder auf eine Aufhebung der ORC Rekrutierung an OriP zurück. Eine Untersuchung hinsichtlich der molekularen Interaktion von ORC mit EBNA1 an DS unter BRACO19 wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit TmPyP4 deuten darauf hin, dass die EBNA1-vermittelte pre-RC Bildung an DS G4-unabhängig ist. Es ist denkbar, dass die Abnahme der EBV-Kopien in Paul Lieberman's Studie von Norseen et al., (2009) auf den inhibierenden Einfluss von BRACO19 auf die Chromosomen-Assoziation basiert und somit die EBV-Genome nicht an die nächste Generation weitergegeben werden.

Eine weitere Erklärung ist, dass TmPyP4 nicht die Spezifität und Affinität hat, die zu der gewünschten Inhibition der OriP-vermittelten Replikation führt. TmPyP4 und BRACO19 könnten aufgrund ihrer verschiedenen Interaktionsweisen mit G4-Strukturen unterschiedliche Affinitäten gegenüber G4-RNA Zielstrukturen *in vivo* haben. Die Affinität von G4-Liganden zu RNA ist noch nicht gut untersucht. Für TmPyP4 ist bekannt, dass es G4-Strukturen in RNA destabilisieren kann, was zu einer Inhibition der Translation führt [201-203].

Bončina et al. (2015) untersuchten *in vitro* die Bindungsaffinitäten für verschiedene G4-Liganden an eine Telomer G4-Struktur, darunter war unter anderen TmPyP4, aber nicht BRACO19 [204]. Nach Berechnung der Bindungskonstanten ist TmPyP4 ein Ligand mit niedriger Affinität und Selektivität gegenüber intramolekularen G4-Strukturen im Vergleich zu ds DNA. Ein weiterer G4-Ligand, PhenDC3, bindet dagegen spezifisch und mit hoher Affinität und Selektivität an G4-Strukturen. Die geringe Selektivität von TmPyP4 gegenüber G4-Strukturen wird in anderen *in vitro* Studien bestätigt [205,206] und könnte auch eine geringe Affinität von TmPyP4 für RNA G4-Strukturen widerspiegeln.

Kim et al., (2003) untersuchten die Selektivität von TmPyP4 im Vergleich zu einem weiteren G4-Liganden, Telomestatin, hinsichtlich ihren Effekten auf zelluläre Prozesse. Die Autoren zeigen in *in vitro* Studien, dass Telomestatin eine höhere Affinität für intramolekulare gegenüber intermolekulare G4-Strukturen hat und selektiv an G4-Strukturen gegenüber ds- und ssDNA bindet. TmPyP4 hingegen zeigt Präferenz für intermolekulare gegenüber intramolekularen G4-Strukturen. Beide Moleküle haben unterschiedliche Effekte in Seeigelembryonen [207]. TmPyP4 induziert Anaphasen-Brücken und inhibiert die Telomeraseaktivität. Telomestatin bewirkt hingegen nur eine Inhibition der Telomerase aber nicht die Bildung von Anaphasen-Brücken, die zu Geninstabilität während der Zellteilung führen [207]. Kim et al., (2003) postulieren anhand dieser Ergebnisse, dass die Auswirkungen von G4-Liganden auf zelluläre Prozesse von deren Selektivität und Affinität gegenüber DNA/RNA G4-Strukturen abhängt.

Die These wird durch eine Studie von Madireddy et al., (2016) unterstützt. Hier wird die Replikation des Kaposi's Sarkom-assoziierten Herpesvirus (KSHV) in infizierten Zellen unter Einfluss von TmPyP4 und PhenDC3 untersucht. Mit den beiden Molekülen wird Replikationsstress ausgelöst, welcher lediglich mit PhenDC3 zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an stress-induzierten Replikationsgabeln und zu einer Aktivierung von „ruhenden“ Origins führt [208]. Die Aktivierung von „ruhenden“ Origins unter Replikationsstress ist ein allgemeines Phänomen [17,19,209]. Die Effekte von PhenDC3 bewirken eine Abnahme der KSHV-Kopienzahl in infizierten Zellen. Die Daten, die in dieser Studie mit TmPyP4 erhalten wurden, sind nicht signifikant. Die Autoren erklären dies mit einer nicht-selektiven Bindung von TmPyP4 an G4-Strukturen gegenüber normaler dsDNA.

Die Studie von Madireddy et al., (2016) zeigt weiterhin, dass die bi-direktionale Bewegung der Replikationsgabel an die „Terminal Repeats“ (TR) Region unter PhenDC3 inhibiert ist. Die TR ist eine stark repetitive Region, die reich an GC-Nukleotiden ist und zahlreiche G4-Motive enthält [208,210,211]. Die Annahme ist, dass durch die Stabilisierung der G4-Motive an die TR-Region die Replikationsgabel blockiert und somit die KSHV-Replikation inhibiert wird.

Die Ergebnisse der reduzierten EBV-Kopienzahlen mit BRACO19 in der Studie von Norseen et al., (2009) könnten ebenfalls auf einen Effekt des G4-Liganden auf die Progression der Replikationsmaschinerie hindeuten, welcher mit TmPyP4 aufgrund der niedrigen Selektivität nicht beobachtet wird. In diesem Zusammenhang könnte eine Untersuchung der Profile von aktiven Replikationsgabeln und der Aktivität von „ruhenden“ Origins in EBV-infizierten Zellen dazu beitragen herauszufinden, ob BRACO19 auf RNA oder DNA Ebene die EBV-Replikation inhibiert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass TmPyP4 keine Affinität zu RNAs hat, die in der Replikation von EBV eine Rolle spielen. Ob RNA G4-Strukturen eine Rolle in der EBV-Replikation spielen ist somit noch nicht geklärt. Eine Identifizierung und Charakterisierung von spezifischen Kandidaten-RNAs für die EBNA1-ORC Interaktion könnte darüber Aufschluss geben.

5.1.2. Die EBNA1-EBER1 Interaktion *in vitro*

Die Interaktion zwischen EBNA1 und EBER1 (b 1-167)

Eine Ribonucleoprotein-Immunpräzipitation (RIP) in EBV-positiven Raji-Zellen ergab, dass die von EBV-exprimierten RNAs EBER1&2 mit EBNA1 assoziieren. Electromobility Shift Assays (EMSA) bestätigen dieses Ergebnis [130,131] (Ergebnisse Kapitel 4.1). Anhand einer EBNA1-RGG Mutante wurde bestätigt dass die RGG-Motive von EBNA1 für die Interaktion essentiell sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit *in vitro* Studien von Snudden et al., (1994) und Lu et al., (2004), die in EMSAs zeigen, dass EBNA1 über seine RGG-Motive an EBER1 bindet. Lu et al., (2004) bestätigen ebenfalls qualitativ die EBNA1-EBER1 Interaktion *in vivo* anhand von RIP-Versuchen. Es wird gezeigt, dass EBNA1 an poly(G)- und poly(U)-Oligonukleotide bindet [117,130]. Ob die Präferenz von EBNA1 zu den poly(G)-

Oligonukleotide mit G4-Strukturbildung in der RNA zusammenhängt bleibt aber unklar.

EBER1 enthält zwei potentielle G4-Strukturen. Eine EBER1 Vollängen-Mutante in der beide G4-Motive durch Punktmutation aufgehoben sind (G-score=0) zeigt im EMSA ebenso Bindung zu EBNA1 wie die „wildtyp“ Variante (Abb. 4.8). Dies deutet darauf hin dass für die Interaktion mit EBNA1 das G4-Motiv nicht essentiell ist. Eine verkürzte EBER1-Variante, EBER1 (b 35-135), die nur das zweite G4-Motiv enthält aber in der das Motiv durch die gleiche Punktmutation wie in der Vollängen-Mutante aufgehoben ist unterstützt auch die Interaktion mit EBNA1 (Abb. 4.8). Diese Versuche demonstrieren dass die Interaktion zwischen EBNA1 und EBER1 G4-unabhängig ist.

Lu et.al., (2004) zeigen, dass EBNA1 verschiedene RNAs bindet, die sich durch einen Guanin- und Guanin + Uracil-Gehalt von mindestens 30% bzw. 50 % sowie einen hohen Anteil an Sekundärstruktur auszeichnen. Mutationsanalysen bzgl. der Sekundärstruktur, belegen, dass EBNA1 eine Präferenz für eine Struktur mit mehreren „Stem-Loops“ („Multistem“ Struktur) als für eine einzige lange „Haarnadel“ Struktur („Hairpin“) hat [130]. Nach der Sekundärstruktur-Vorhersage mit dem Programm „The Vienna RNA Web Suite“ [179,180] wird tatsächlich eine hohe Wahrscheinlichkeit zur „Multistem“ Struktur Bildung nicht nur bei der „wildtyp“ EBER1 aber auch für die EBER1 Mutanten berechnet. Für die Vollängen-EBER1 Doppelmutante, in der beide G4-Motive aufgehoben sind werden sieben „Stem-Loops“ vorhergesagt. Für die verkürzte EBER1 G4-Mutante sind es vier „Stem-Loop“-Strukturen (Abb. 4.5).

Eine unstrukturierte synthetische RNA, die keine G4-Motive enthält und die eine niedrige Wahrscheinlichkeit für stabile Sekundärstrukturen hat, wird nicht von EBNA1 gebunden was weiterhin die These stärkt, dass EBNA1 nicht *per se* G4-Motive und Guanin-reiche RNA, sondern präferenziell „Multistem“ Strukturen bindet [130,131].

Die Interaktion zwischen EBNA1 und verkürzten Varianten von EBER1

Ein partieller RNase T1 Verdau des EBNA1-EBER1 Komplex *in vitro* diente zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne. Die Sequenzierung der geschützten EBER1-Fragmente hat 100 bp und bei längerem RNase T1 Verdau 41 bp der EBER1 als potentielle EBNA1-Interaktionsdomäne identifiziert (EBER1 (b 35-135), bzw. EBER1 (b 84-125)). In EMSAs wird die Interaktion nur für EBER1 (b 35-135), nicht aber für

EBER1 (b 84-125) bestätigt. Die Strukturvorhersage zeigt, dass diese drei (III-V) bzw. eine „Stem-Loop“ Struktur (V) von EBER1 besitzen (Abb.). Dies bestätigt wieder die Präferenz von EBNA1 zu „Multistem“ Strukturen als zu einzelnen „Hairpins“ [130]. EBER1 (b 84-125) wurde zwar im partiellen Verdau als potentielle Kernsequenz identifiziert, die Interaktion zu EBNA1 wird aber in EMSA nicht verifiziert. Möglicherweise handelt es sich um eine instabile Wechselwirkung, die unter den Bedingungen des EMSA nicht erhalten bleibt (16 h, 4°C, 25 V). Oder dieses EBER1-Fragment stellt ein Spaltprodukt einer nicht-gebundenen EBER1 im partiellen Verdau dar, das isoliert und sequenziert wurde.

EBNA1 trägt zur Proliferation und zum Überleben von EBV-infizierten Zellen bei [212-214]. EBNA1 ist ebenso wichtig für eine effiziente Transformation von B-Zellen [215,216]. Studien deuten darauf hin, dass EBNA1 onkogenes Potential besitzen könnte, welches möglicherweise auf die Interaktion mit zellulären Proteinen und auf die Funktion von EBNA1 als Transkriptionsfaktor beruht, der Expression von transformierenden Genen unter anderem an FR aktiviert [215,217-219]. Für die Transkriptionsfunktion sind die RGG-Motive im N-terminalen Bereich von EBNA1 essentiell [105,220]. EBNA1 könnte den gleichen Mechanismus für seine Transkriptionsfunktion nutzen wie das RGG-Protein E2 des Humanen Pappilomvirus. Dieser Transkriptionsfaktor interagiert mit der RNA p32 und induziert auf diese Weise die Genexpression [221]. RNA könnte somit in der EBNA1-vermittelten Genexpression involviert sein. Ebenso ist die Assoziation von EBNA1 mit den Metaphasenchromosomen abhängig von den RGG-Sequenzen und möglicherweise spielen RNAs auch hier eine Rolle [217,218].

Ob EBNA1 sein onkogenes Potential in Zusammenspiel mit RNA entfaltet, ist bislang nicht bekannt. Das Wissen über strukturelle Eigenschaften der EBNA1-RNA Interaktion könnte helfen kleine Moleküle als Inhibitoren zu generieren, um die Biologie von EBV-infizierten Zellen in Abhängigkeit der EBNA1-RNA Interaktion zu studieren.

Bisher ist eine Aufklärung der Struktur des N-Terminus von EBNA1 nicht gelungen, da dieser durch den repetitiven Glyzin-Alanin Bereich unstrukturiert ist. Die Bindung zu einer RNA-Sequenz könnte den N-Terminus strukturieren und die Analyse über Kristallstrukturanalyse ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde die EBER1 (b 35-135) als eine Kernsequenz für die EBER1-EBNA1 Interaktion identifiziert. Eine Kristallstrukturanalyse des N-Terminus von

EBNA1 zusammen mit der Kernsequenz von EBER1 könnte Aufschluss über mögliche Inhibitor Strukturen geben.

5.1.3. Die EBNA1-ORC-EBER1 Interaktion *in vitro* und *in vivo*

Bislang waren keine spezifischen RNAs für die Interaktion von EBNA1 zu ORC bekannt. Die EBV-exprimierte RNA EBER1 wurde in dieser Arbeit als EBNA1-spezifische RNA bestätigt. Ob die EBER1 eine funktionelle Rolle in der ORC-EBNA1 Interaktion spielt, wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Der *in vitro* ORC „pull-down“ ergibt eine ca. 3-fache Anreicherung von EBNA1 in Anwesenheit von EBER1 an Orc3. Die Fähigkeit der EBER1 die Interaktion zu vermitteln wird somit im *in vitro* System gezeigt. EBER1 stellt somit die als erste *in vitro* identifizierte spezifische RNA für die EBNA1-ORC Interaktion dar.

In EBV-infizierten Zellen zeigen die EBER-RNAs keine signifikanten Effekte auf die Replikation des EBV-Genoms. Bei der Bestimmung der EBV-Kopienzahl über qPCR wird keine Veränderung der relativen EBV-Kopienzahl in EBER^{k.o.}- LCL im Vergleich zur EBER⁺-LCL beobachtet. Dieser Befund korreliert mit ChIP-Analysen die eine vergleichbare Anreicherung für Orc2 bzw. Mcm3 an das virale Origin-Element DS in EBER⁺- und EBER^{k.o.}- LCL zeigen.

Die *in vitro* Studie von Moriyama et al., (2012) demonstriert, dass die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC an DS RNA-unabhängig verläuft. Die Assoziation von ORC, EBNA1 und einer weiteren pre-RC Komponente Cdc6 wurde *in vitro* unter Verwendung gereinigter Proteine an der DS-Sequenz untersucht. Nur wenn DS präsent ist, findet die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC statt, die RNA-unabhängig ist [222]. Möglicherweise entsteht durch das Binden von EBNA1 an DS eine Konformation in EBNA1, die die Fähigkeit von EBNA1 zu einer direkten ORC Interaktion favorisiert. In der Abwesenheit von DS ist dementsprechend die Bindung von EBNA1 zu RNA favorisiert, welche die Ergebnisse von Paul Lieberman's Labor erklären könnten [117,166].

Diese Hypothese steht insofern mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen in Einklang, als dass die Interaktion von EBER1 *in vitro* die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC (ohne DS) unterstützt, die EBER-RNAs in EBV-infizierten Zellen aber keine Rolle für die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC an DS spielen.

Wenn die RNA-unabhängige Interaktion *in vivo* favorisiert ist, dann stellt sich jedoch die Frage, ob die beobachtete Interaktion *in vitro* zwischen ORC, EBNA1 und RNA in EBV-infizierten Zellen eine Rolle spielt.

Welche Funktion und Rolle die EBER-RNAs in infizierten Zellen erfüllen ist noch unklar und wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird eine Tumor-fördernde Eigenschaft der EBER-RNAs, wie Tumorentstehung und ein erhöhtes Transformationspotential bzgl. des Wachstums von infizierten B-Zellen beschrieben [122-124]. Andere Studien hingegen deuten darauf hin, dass EBER-RNAs nicht essentiell für die Primärinfektion, virale Replikation und B-Zell-Transformation sind [125-127]. Ebenso funktioniert das OriP/EBNA1 Plasmid-System in humanen Zellen, die keine EBER-RNAs exprimieren ([132,133,223], Ergebnisse Kapitel 4.2).

Für die EBER^{k.o.}- LCL wurde ein langsames Wachstum im Vergleich zur EBER-exprimierenden LCL festgestellt. Außerdem brauchen die Zellen eine höhere Zelldichte zur Aufrechterhaltung der Kultur. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Studie von Yajima et al., (2005). Auch hier stellen die Autoren eine verlangsamte Wachstumsrate in Abhängigkeit der Zelldichte für eine EBER-defiziente LCL fest. Yajima et al., (2005) postulieren dass das viral exprimierte Membranprotein LMP1 die Abwesenheit der EBER-RNAs kompensiert. Für LMP1 wird eine antiapoptotische Funktion sowie die Fähigkeit zur Induktion der Expression von Wachstumsfaktoren beschrieben [224-228]. Eine kürzlich veröffentlichten Studie unterstützt diese Hypothese, die eine redundante Funktion der EBER-RNAs zu LMP1 bei der Aktivierung von AKT beschreibt, die eine Signalkaskade für das Überleben von Zellen auslöst [229]. Ein Replikationsdefekt in der EBER^{k.o.}-LCL wird ausgeschlossen, da die EBV-Kopienzahl in EBER-defizienter und EBER-exprimierender LCL vergleichbar ist. Das langsame Wachstum der EBER-defizienten Zelllinie wird somit auf eine Rolle der EBER-RNAs in der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren und in der Aktivierung von Überlebenssignalen zurückgeführt.

Dass die EBER-RNAs *in vivo* nicht essentiell für die ORC Rekrutierung und pre-RC Bildung an DS sind, könnte mit einer redundanten Funktion von zellulären RNAs erklärt werden, die im Rahmen dieser Doktorarbeit identifiziert werden sollten.

5.1.4. Die Rolle von zellulären RNAs in der ORC-Chaperon Interaktion

Wie ORC mit seinen Chaperonen interagiert und somit potentiell Replikationsursprünge markiert ist noch nicht im Ganzen verstanden. Im Kontext von EBV wird ORC an den viralen Replikationsursprung OriP rekrutiert [91]). Da in diesem Fall ein definierter Replikationsursprung vorliegt, kann die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC untersucht werden. Möglicherweise lassen sich daraus Schlüsse für die Interaktionen von ORC mit seinen Chaperonen im zellulären Kontext gewinnen. Die Annahme ist, dass EBNA1 das zelluläre Chromatin-Protein HMGA1a funktionell imitiert [74,112]. Dies wird dadurch belegt, dass der N-Terminus von EBNA1 funktionell durch die HMGA1a Sequenz mit Erhalt der Replikationsfunktion von OriP-Plasmiden ersetzt werden kann [101,116]. HMGA1a ist ein Architektur-Protein des Chromatins. Es bindet an AT-reiche Regionen im Genom und bewirkt Konformationsänderungen der DNA, die einer Regulierung der Genexpression dienen [115,230,231]. In der Studie von Thomae et al., (2008) wurde gezeigt, dass HMGA1a *in vitro* und *in vivo* mit ORC interagiert. Die Autoren postulieren, dass durch die Interaktion Origins im Heterochromatin markiert werden [74]. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von HMGA1a zu ORC wie für EBNA1 über RG-reiche Motive vermittelt wird und RNA-abhängig ist [117]. Um weitere Einblicke in den Mechanismus der ORC-Chaperon Wechselwirkung zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die RNAs ermittelt werden, die eine Rolle in der EBNA1-ORC Interaktion spielen. Da die EBER-RNAs keine Rolle in der EBNA1-ORC Interaktion *in vivo* spielen konzentrierten wir uns auf die Identifizierung von zellulären RNAs, die an EBNA1 binden.

Die kleinen nicht-kodierenden Kern-RNAs (snRNAs) RNU1&2 wurden in einem ersten RIP-Experiment als EBNA1-spezifische zelluläre RNAs identifiziert (Christoph-Erik Mayer, AG Schepers, unveröffentlichte Daten). Generell wurde beobachtet, dass eher eine Gruppe von snRNAs, aber keine einzelnen spezifischen RNAs an EBNA1 assoziieren. Anhand des optimierten RIP-Protokolls wurde eine 1,7-fache Anreicherung von RNU1 an EBNA1 erzielt. Somit stellen die RNUs möglicherweise potentielle Kandidaten für weitere Analysen dar. Um weitere zelluläre RNAs zu identifizieren, wurden spezifische EBNA1-assoziierte RNAs anhand Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation (RIP) aus EBER-defizienten LCL, Raji-Zellen

und EBER-exprimierende LCL isoliert. Die Umschreibung in cDNA für die Sequenzierung erfolgte im Labor von Adam Grundhoff in Hamburg. (Die Sequenzierung und Auswertung wurde bis zur Beendigung dieser Arbeit nicht fertig gestellt.)

Nach der „High-Throughput“ Sequenzierung werden die Ergebnisse der drei Zelllinien hinsichtlich gemeinsamer zellulärer RNAs analysiert. Potentielle Kandidaten-RNAs sollen dann auf spezifische Sequenz- und Strukturmerkmale bioinformatisch analysiert werden.

Da EBNA1 eher Struktur- als Sequenz-abhängig bindet, ist zu erwarten, dass nach der Analyse möglicherweise eine Gruppe von RNAs mit gemeinsamen Sequenzmotiven identifiziert wird. Möglicherweise kann hier der Aspekt der G4-Motive näher geklärt werden.

Ein Vergleich mit HMGA1a-assoziierten RNAs könnte die RNAs weiter eingrenzen, die die ORC-Chaperon Interaktion im zellulären Kontext vermitteln. Potentielle Kandidaten RNAs stellen hier die sogenannten Y RNAs dar. Diese sind vier kleine strukturierte „Stem Loop“ RNAs, die in Wirbeltieren konserviert und essentiell für die Initiation der Replikation von chromosomaler DNA sind [232]. *In vitro* wurde gezeigt, dass ORC mit allen vier RNAs *in vitro* interagiert [65]. In der gleichen Studie wird auch für HMGA1a eine Interaktion mit zwei der vier Y RNAs beobachtet. Die Autoren postulieren, dass möglicherweise eine Teilmenge von Origins über die HMGA1a-ORC- Y RNA Interaktion definiert wird.

Noch ist der molekulare Mechanismus unklar, wie Y RNAs die Initiation der Replikation steuern. Es ist denkbar, dass spezifische RNAs ORC direkt an Replikationsursprünge leiten. Ein Hinweis dafür liefert eine Studie in *Tetrahymena*, in der gezeigt wird, dass die 26T RNA eine Komponente von ORC ist und den Komplex über RNA-DNA Hybridisierung an ribosomale DNA leitet [233].

In vitro wurde gezeigt, dass die Orc1 Untereinheit bevorzugt einzelsträngige DNA und RNA bindet und ORC keine Präferenz für doppelsträngige DNA hat [117,182]. Eine Hypothese ist, dass RNA als ein Mediator dienen könnte, der ORC direkt zu Origins in höheren Eukaryonten dirigiert. Die RNA könnte wie in *Tetrahymena* durch Hybridisierung mit DNA ORC an spezifische Stellen im Genom, z.B. an „R-Loop“ Strukturen (siehe Kapitel 5.3), lotsen.

Eine Identifizierung von ORC-assoziierten RNAs wird im Vergleich mit EBNA1/HMGA1a-assoziierten RNAs zum einen Hinweis darauf geben, welche

spezifischen RNAs in der ORC-Chaperon Interaktion eine Rolle spielen. Zum anderen könnten Hinweise auf die RNAs erhalten werden, die ORC direkt an Origins leiten.

5.2. Untersuchung der Effizienz von Replikationsursprüngen hinsichtlich G4-Strukturen im Plasmid-System

G4-Motive werden durch Korrelationsstudien mit der Aktivität von Replikationsursprüngen (Origins) in Verbindung gebracht [11,68]. Eine funktionelle Analyse in einem genomischen ektopischen Kontext ist eher zeitaufwändig und kompliziert. Um die Funktionalität von potentiellen Origins zu überprüfen, ist es von Vorteil ein einfaches, schnelles und zuverlässiges Testsystem zu haben. Mit dem OriP-Plasmid-System können mehrere Kandidaten-Sequenzen unkompliziert und relativ einfach auf Funktionalität überprüft werden. Außerdem erlaubt das OriP-System eine genetische Manipulation der Plasmide für Mutationsanalysen. Ein weiterer Vorteil der OriP-Sequenz ist, dass Replikations- und Plasmiderhaltungsfunktion räumlich voneinander getrennt untersucht werden können. Eine stabile Erhaltung der Plasmide ist durch FR gewährleistet, während verschiedene DNA-Sequenzen anstelle von DS eingefügt und auf ihre Replikationskompetenz getestet werden können. In dieser Arbeit wurde die Replikationseffizienz der durch „Short-Nascent-Strands“ Analysen neu identifizierten Sequenzen cc2 und cc4 aus dem Maus-Genom hinsichtlich Länge, Orientierung und G4-Motive untersucht.

5.2.1. Charakterisierung von cc2 und cc4 im OriP-Plasmid-System

In den ersten Experimenten des Plasmid-Wiedergewinnungsversuchs wurde als Negativ-Kotroll-Plasmid das delta-DS Plasmid verwendet. Jedoch wurde für das Plasmid restliche Replikationsaktivität festgestellt. Dies wurde auch in der Studie von

Gerhardt et al., (2006) beobachtet und wurde mit der Anwesenheit des Rep* Elements begründet. Dieses Element liegt 3' von der DS Sequenz und es wurde gezeigt, dass es DS funktional, aber ineffizient ersetzen kann [234]. Die relative Anreicherung gegenüber diesem Plasmid ist nicht sehr hoch, aber signifikant für OriP und die cc2 500 und cc4 500 bp Sequenzen. Um bessere Verhältnisse der Replikationsaktivität gegenüber der Negativ-Referenz zu erhalten wurde das 4 x TetO Plasmid als Negativ-Kontrolle im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch verwendet. Dieses enthält anstelle des DS Elements vier hintereinander folgende Sequenzen von Tetrazyklin Operatoren (4 x TetO), die keine Replikationsaktivität zeigen [118]. Tatsächlich konnte das Verhältnis von OriP zur Negativreferenz unter Verwendung des 4 x TetO Plasmids verbessert werden. Die Steigerung der Effizienz äußert sich in einer Anreicherung von ca. 3,5-fach zu delta DS bis 10-fach zu 4 x TetO für das OriP-Plasmid. Eine Erhöhung des Verhältnisses wurde auch für die cc2 500 Sequenz erzielt (von 2,5-fach auf 4-fach) (Abb. 5.2). Folglich wurden die Analysen mit den G4-Mutanten und cc2 500 Multimeren mit dem 4 x TetO Plasmid als Negativ-Referenz durchgeführt.

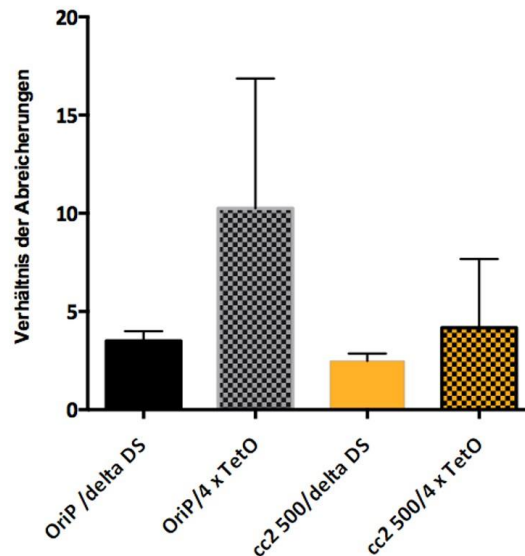


Abb. 5.2: Verbesserung der Verhältnisse der Anreicherung zum Negativ-Referenzplasmid im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch. Replikationseffizienzen von OriP und cc2 500 Sequenz im Verhältnis zum entsprechenden Negativ-Referenzplasmid. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n=5 für 4 x TetO, n=7 für OriP).

Die OriP-Sequenz diente als Positiv-Referenz und zeigte höchste Replikationseffizienz in Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen. Die 2 kb bzw. 1,9 kb großen Fragmente von cc2 und cc4 zeigen keine Replikationsaktivität. Die 500 bp Sequenzen von cc2 und cc4 replizierten sehr effizient im Plasmid-System. c-Myc diente als humaner Referenz-Origin. Eine 2,4 kb große Region 5' des c-Myc Promotors zeigt im Plasmid-System autonome Replikationsaktivität und gewährleistet stabilen Erhalt der Plasmide über 300 Zellgenerationen unter Selektion [188,191,235]. 1,2 kb der c-Myc Sequenz, die 5' vom Promotor entfernt liegen, sind ausreichend für die autonome Replikationsaktivität und wurden für die Plasmid-Wiedergewinnungsexperimente verwendet [191]. Die Replikationseffizienz der cc4 500 bp Sequenz liegt auf dem Niveau von c-Myc. Das cc2 500 bp Fragment replizierte sogar 1,5-fach mehr, als die c-Myc Sequenz. In Bezug zu c-Myc wird ersichtlich, dass die cc2 500 und cc4 500 Sequenz im Plasmid-System sehr effizient die Replikation unterstützen.

Um Effekte der Orientierung zu testen wurden die Sequenzen von cc2 500 und cc4 500 umgekehrt in das Plasmid kloniert (Abb. 4.18A (exemplarisch für cc2)). Diese umgekehrten Sequenzen zeigen eine signifikante Abnahme der Replikationskompetenz im Vergleich zu ihren gerichteten Pendants (Abb. 4.19). Eine mögliche Erklärung liefert das Modell von Valton et al.,(2014), in dem postuliert wird, dass das

G4-Motiv zusammen mit einer weiteren Sequenz in *cis* das Replikator-Element bildet und die Lage des G4-Motivs auf Leit- oder Gegenstrang die präzise Startstelle für die Replikation bestimmt (Abb. 5.3A). Diese tritt ca. 250 bis 280 bp 3' zu den G4-Motiven in Maus bzw. Humanen Zellen auf [12,14]. Für die gerichteten 500 bp Sequenzen von cc2 und cc4 500 ist demnach auszugehen, dass die Initiation jeweils außerhalb auf der Plasmidsequenz liegt. Bei Umkehrung der Sequenz beginnt die Replikation innerhalb der OriP-Sequenz zwischen FR und der cc2 (bzw. cc4) Sequenz (Abb. 5.3B). Für das FR-Element wurde gezeigt, dass es bei EBNA1-Bindung als Barriere und Terminationsstelle für die virale Replikation fungiert [236-238]. Es ist möglich, dass die Replikationseffizienz für die umgekehrten cc2 und cc4 500 Sequenzen deshalb reduziert ist, weil die Replikation an FR blockiert wird.

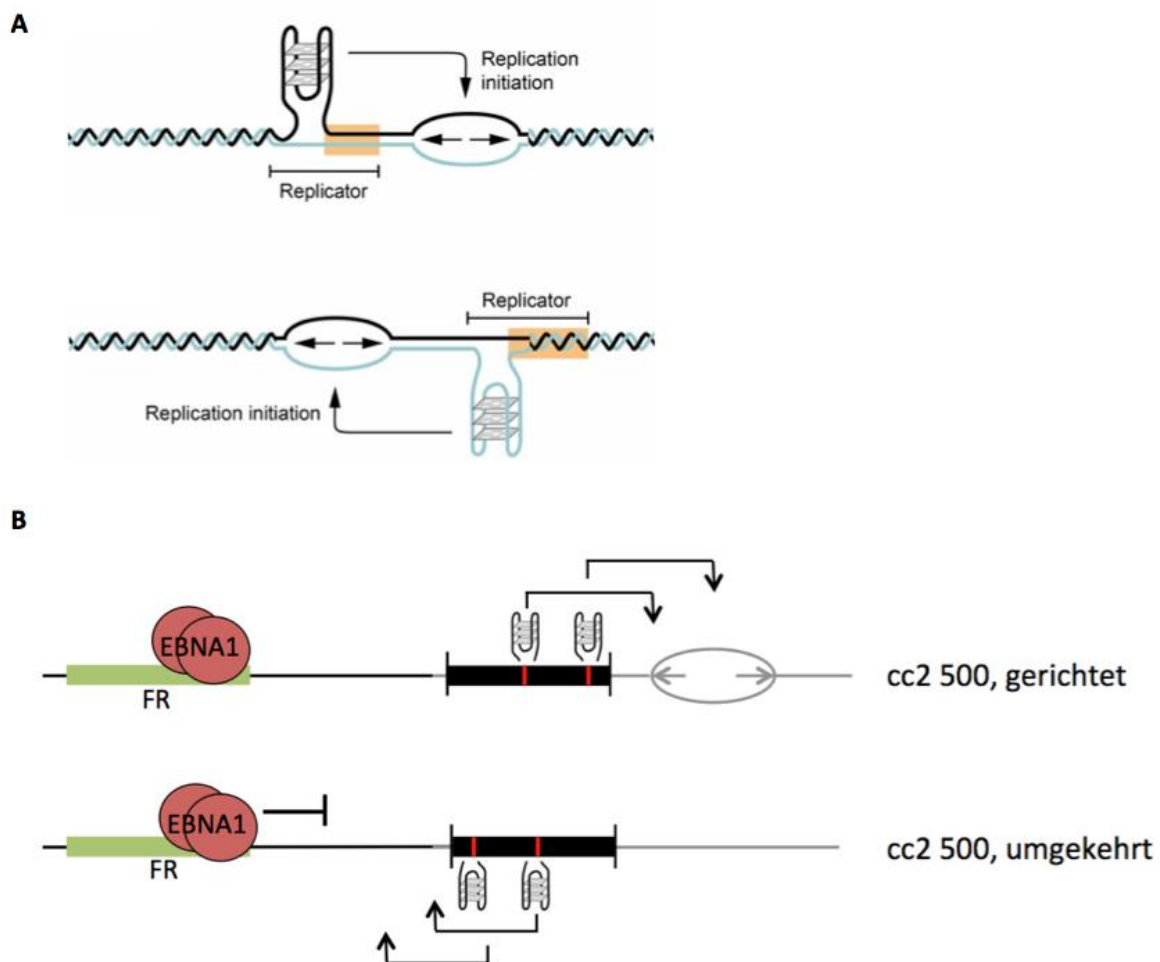


Abb. 5.3: Einfluss von G4-Strukturen auf die Initiation der DNA Replikation (Modell von Valton et al., (2014)). (A) Die Replikator-Sequenz setzt sich aus der G4-Struktur und dem *cis*-Modul (oranges Rechteck) zusammen. Die Position der G4-Struktur bestimmt die Stelle der Replikationsinitiation (Bild entnommen aus [151]). **(B)** Für die gerichtete cc2 500 Sequenz (schwarzes Rechteck) liegen die Initiationsstellen der Replikation für G4#1 und G4#2 (rote Balken) ca. 280 bp 3' auf der Plasmidsequenz (durch Pfeile gekennzeichnet, graue Linie). Für die umgekehrte cc2 500 Sequenz

liegen die Initiationsstellen der Replikation für G4#1 und G4#2 ca. 280 bp 3' auf der OriP-Sequenz (durch Pfeile gekennzeichnet, schwarze Linie). FR gebunden von EBNA1 blockiert die Replikation.

5.2.2. Der Einfluss der G4-Motive auf die Replikation von cc2 500 im Plasmid-System

In der Studie von Valton et al., (2014) wurde die Aktivität von zwei Replikationsursprüngen aus der lymphoiden Huhn-Zelllinie DT 40 [239] hinsichtlich G4-Motive untersucht. Dabei wurde der gut charakterisierte Origin β^A und ein neuer Origin med14 verwendet (Abb. 5.4). Von β^A und von med14 Origin wurden ein bzw. zwei G4-Motive mutiert. Die Aktivität der Origins wurde anhand von „Short Nascent Strands“ analysiert. Dabei wurde herausgefunden, dass in med 14 die beiden G4-Motive kooperativ und additiv zur Aktivität des Origins beisteuern.

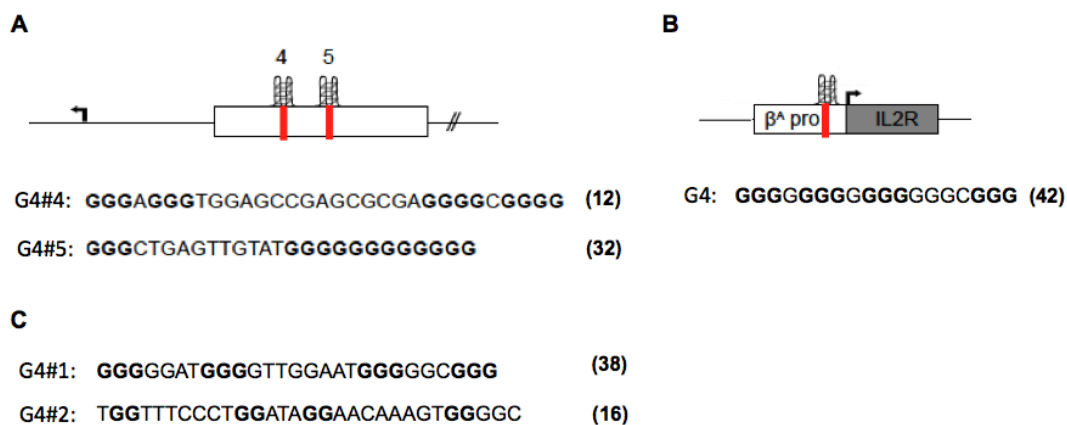


Abb. 5.4: Schematische Darstellung von Replikationsursprüngen in Huhn-Zellen. (A) med14 Origin (weißes Rechteck) mit zwei G4-Motiven G4#4 und G4#5 (rote Balken), die ca. 280 bp 5' der Replikationsinitiationsstelle liegen. **(B)** β^A Origin (weißes Rechteck) mit G4-Motiv (roter Balken), das ca. 280 bp 5' der Replikationsinitiationsstelle liegt. IL2R: Gen des Interleukin 2 Rezeptors. Zahlen in Klammern geben den G-score für das entsprechende G4-Motiv an. Abb. entnommen und modifiziert aus [68]. **(C)** G-scores und G4-Motive der cc2 500 Sequenz

In der cc2 500 Sequenz sind nur zwei G4-Motive verglichen mit neun Motiven in cc4 500 enthalten. Die funktionelle Analyse hinsichtlich der G4-Motive durch Mutationsanalysen ist mit der cc2 500 Sequenz erleichtert und wurde deshalb für die weitere Untersuchung verwendet.

Um die Wirkungsweise der G4-Motive auf die Replikationsaktivität zu untersuchen, wurden Mutationen in den zwei G4-Motiven der cc2 500 Sequenz generiert. Dies

resultierte in zwei einzelnen Mutanten von jeweils G4#1 und G4#2 und einer Doppelmutante, die im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch analysiert wurden. Die Doppelmutante zeigt keine Replikationsaktivität, was vergleichbar mit dem Replikationsniveau der G4#2-Mutante ist. Eine Mutation des ersten G4-Motivs resultierte in einer Replikationseffizienz auf dem Niveau der Negativkontrolle (4 x TetO), replizierte jedoch ca. 3 mal mehr als die Doppel und G4#2-Mutante (Abb. 4.20B). Das zweite G4-Motiv scheint somit eine entscheidende aber nicht ausreichende Funktion für die Replikationseffizienz der cc2 500 Sequenz zu haben. Nur bei Anwesenheit beider G4-Motive wird die Effizienz von cc2 500 erreicht. Dies zeigt, dass für die Replikationseffizienz des cc2 500 eine Kooperation beider G4-Motive benötigt wird. Die Wirkung der Motive ist in diesem Fall nicht additiv, wie sie von Valton et al., (2014) für den med14 Origin beschrieben wird.

Ein 330 bp-Fragment von cc2, eine Deletion von 78 bp stromaufwärts vom ersten und 92 bp stromabwärts vom zweiten G4-Motiv bzgl. der cc2 500 Sequenz, hebt die Replikationsfunktion auf. In der cc2 500 Sequenz tragen somit noch weitere Elemente zur Aktivität bei. Möglicherweise handelt es sich um eine weitere kooperative Sequenz in *cis*, wie es in Valton et al., (2014) für den β^A Origin beschrieben wurde.

Für die einzelnen G4-Motive wurde mit der „QGRS Mapper“ Software [181] die Wahrscheinlichkeit zur G4-Struktur-Bildung mit dem G-score angegeben. Der G-score ist ein Maß dafür, wie wahrscheinlich ein G4-Motiv eine G4-Struktur ausbildet. Für die Berechnung wird die Anzahl der G4-Tetraden und die Anzahl der dazwischenliegenden Nukleotide berücksichtigt. Je mehr G4-Tetraden gebildet und weniger Nukleotide zwischen den Tetraden liegen, desto stabiler ist die Struktur [240]. Die G-scores für die zwei G4-Motive G4#4 und G4#5 im med14 Origin mit G-scores von 12 bzw. 32 sind vergleichbar mit denjenigen für G4#1 und G4#2 in der cc2 500 Sequenz (G-score ist 38 bzw. 16) (Abb. 5.4B/C). Die G4-Motive mit G-scores von 12 und 16 bilden zwei, diejenigen mit G-scores von 32 und 38 drei Tetraden aus. Eine Mutation in med14 im G4-Motiv #5 mit drei Tetraden bewirkt eine größere Abnahme der Replikationsaktivität als die Mutation in G4#4 mit zwei Tetraden [68]. Dies würde bedeuten, dass stabilere G4-Strukturen einen signifikanteren Einfluss auf die Replikationsaktivität haben. Interessanterweise ist es bei den Mutationsanalysen von G4#1 und G4#2 in cc2 500 nicht so deutlich. In diesem Fall wird tendenziell eine stärkere Abnahme der Replikationsaktivität mit einer Mutation im zweiten G4-Motiv

beobachtet, dass nur zwei Tetraden ausgebildet. Dies zeigt, dass die Höhe des G-scores von einzelnen G4-Motiven nicht *per se* deren Einfluss auf die Replikationseffizienz eines Origins widerspiegelt. Eine weitere Untersuchung mit synthetisch generierten G4-Motiven mit unterschiedlicher Stabilität könnte Einsicht in die Parameter (Anzahl der G-Tetraden, Anzahl der dazwischen-liegenden Nukleotide) geben, die für die Replikationsfunktion benötigt werden. Da G4-Strukturen auch inhibierend auf die DNA Replikationsmaschinerie einwirken [197,241], lohnt sich die Aufklärung, welche Parameter von G4-Motiven die Effizienz und welche die Inhibition beeinflussen.

5.2.3. Einfluss der Multimerisierung auf die Replikationseffizienz von cc2 500 bp

Die Replikationseffizienz von Multimeren der cc2 500 bp Sequenz wurde in dieser Arbeit getestet, um zu untersuchen, ob die G4-Motive G4#1 und G4#2 bei Multimerisierung zu einer Effizienzsteigerung führen und möglicherweise das Niveau eines viralen Replikationsursprungs, wie OriP, erreichen. Außerdem wurde untersucht ob das zweite G4-Motiv alleine bei Multimerisierung der cc2 500 delta G4#1 Sequenz zu einer Effizienzsteigerung führt und die Replikationsfähigkeit des Monomers induzieren kann. Dass eine Multimerisierung von Origin-Sequenzen zu einer Effizienzsteigerung der Replikation im Plasmid-System führt, zeigt die Studie von Gerhardt et al., (2006). Hier hat der neu identifizierte Replikationsursprung or6 eine moderate Replikationsaktivität im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch. Mit einer Multimerisierung der 250 bp Sequenz des or6 wird ein linearer Anstieg der Replikationseffizienz im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch mit der Monomer-, Dimer- und Tetramer-Sequenz bewirkt. Die Hexamer-Sequenz des or6 repliziert nicht mehr. Die Multimerisierung der relativ schwach-replizierenden or6 Sequenz erzielt hier eine Erhöhung der Replikationseffizienz [110]. Eine Effizienzsteigerung wird ebenfalls mit Multimeren des Rep*-Elements von OriP beobachtet. Acht hintereinander folgende Sequenzen von Rep* replizieren genauso effizient wie das DS-Element [238].

Von der cc2 500 Sequenz wurden Dimere und Tetramere der Sequenzen generiert. In beiden Fällen nimmt die Replikationsaktivität für die Dimere tendenziell ab. Die Tetramer-Sequenzen replizieren nicht mehr. Dies zeigt, dass mit einer Multimerisierung eines effizienten Motivs nicht *per se* die Replikationseffizienz erhöht bzw. induziert wird. Ein möglicher Grund für die Abnahme der Replikationsaktivität ist, dass die zusätzlichen G4-Motive die Replikation eher inhibieren anstatt erhöhen. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Kapitel näher eingegangen. Dagegen beinhaltet der *ori6* Origin eine AT-reiche Sequenz, die die Entwindung der DNA und somit den Start der Replikation möglicherweise begünstigt [110].

5.2.4. Faktoren, die die Aktivität von Origins im Plasmid-System beeinflussen

Die beiden Vollängen-Sequenzen von cc2 und cc4 replizieren nicht im Plasmid-System. Die Gründe dafür sind nicht klar und können vielfältig sein. Auch G4-Motive sind Hindernisse für die Replikationsmaschinerie [197,242]. Möglich ist, dass eine Zunahme der Anzahl an G4-Motiven innerhalb einer Sequenz mit einer Abnahme der Replikationsaktivität korreliert. Die These wird durch die Beobachtung gestützt, dass die *OriP*-Sequenz keine G4-Motive enthält und im Plasmid-System am besten repliziert. Die cc2 500 Sequenz hat mit zwei G4-Motiven die zweithöchste Effizienz, gefolgt von cc4 500 mit neun und c-Myc mit 13 G4-Motiven. Die jeweils ca. 2 kbp Sequenzen von cc2 und cc4 beinhalten 16 und 20 G4-Motive und zeigen keine Replikationskompetenz im Plasmid-System. Im ektopischen Kontext, in dem die Vollängen-Sequenzen von cc2 und cc4 Replikation vermitteln (persönliche Mitteilung M. Méchali), sind im Genom möglicherweise andere Faktoren in *cis* oder in *trans* an der Regulation der G4-Motive beteiligt, die im Plasmid-System nicht vorhanden sind.

Ebenso denkbar ist, dass sich eine weitere inhibierende Sequenz innerhalb von cc2 und cc4 befindet. Dass Bereiche in Origin-Sequenzen die Replikationseffizienz negativ beeinflussen, zeigen Valton et al., (2014) den β^A Origin. Unterstützt wird die These zudem mit der Untersuchung einer ca. 1000 bp großen Sequenz des LaminB2 Origins im *OriP*-Plasmid-System in unserem Labor (Dissertation Jeannine Gerhardt).

Diese Sequenz zeigte keine Replikationsaktivität, ein ca. 750 bp Fragment des LaminB2 hingegen schon. Die Annahme ist, dass eine zusätzliche Sequenz eine inhibierende Funktion auf die Replikation des 1000 bp Sequenz des LaminB2 ausübt.

In der Studie von Haase et al., (1991) wurde beobachtet, dass die Replikation von FR-Plasmiden mit humanen Sequenzen als Replikationsursprüngen durch eine 5' vorgeschaltete Sequenz des CMV Promotors inhibiert wird. Nach Aktivierung des CMV Promotors durch Insertion des GFP Gens wurde die Inhibition aufgehoben [243]. Dies deutet darauf hin, dass aktive Transkription stimulierend auf den Replikationsprozess einwirkt.

Auch die 1000 bp lange Sequenz des LaminB2 Origins enthält eine inaktive Promotor-Sequenz, die die Replikation im Plasmid-System möglicherweise inhibiert, während die verkürzte Variante ohne Promotor-Sequenz hingegen die Replikation unterstützt (Dissertation Jeannine Gerhardt).

Ob Transkriptionsaktivität die Replikationseffizienz der cc2 und cc4 Sequenzen beeinflusst wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, aber ist sicherlich ein interessanter Aspekt für weitere Analysen. Eine exemplarische Analyse der cc2 Sequenz hinsichtlich Transkriptionsfaktorbindestellen unter Verwendung der Software PROMO 3.0 [244,245], ergab, dass die Anzahl der potentiellen Bindestellen von 906 für die cc2 Vollängen-Sequenz auf 321 für cc2 500 bis hin zu 164 für die 330 bp Sequenz abnimmt (Abb. 9 (Anhang)). Ein möglicher Grund, warum die 2 bzw. 1,9 kb langen Sequenzen von cc2 (und cc4) im ektopischen Kontext replizieren, könnte demzufolge auf aktive Promotoren zurückgeführt werden, die jedoch im Plasmid-System inaktiviert sind und inhibierend auf die Replikation einwirken.

Studien zeigen, dass Regulationsproteine der Transkription sowohl positiv als auch negativ DNA Replikation beeinflussen können [246,247]. Anhand der Ergebnisse mit dem 330 bp-Fragment von cc2 im Plasmid-Wiedergewinnungsversuch wurde gezeigt, dass eine weitere Sequenz in *cis* für die Replikationsfunktion von cc2 500 benötigt wird. Valton et al., (2014) grenzten die Sequenz des *cis*-Moduls für die Aktivität des β^A Origins auf 200 bp ein. Die Autoren postulieren, dass die Bindung von weiteren Proteinfaktoren, wie Transkriptionsfaktoren an die *cis*-Sequenz die Initiation der Replikation erleichtert. Dies könnte auch für die cc2 500 Sequenz der Fall sein. Die minimale *cis*-Sequenz könnte in weiteren Analysen eingeschränkt und auf Bindungsspezifischer Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

Limitierend auf die Untersuchung im Plasmid-System könnte auch die Länge der zu untersuchenden Sequenzen wirken. Unterstützt wird diese These, dass die Sequenzen von cc2 und cc4 die Replikation mit einer Länge von 2 bzw. 1,9 kb im Plasmid-System nicht unterstützen, im ektopischen zellulären Kontext von HeLa-Zellen jedoch Replikation vermitteln. Zudem wurde für die Dimer- und Tetramer-Sequenzen von cc2 500 mit einer Länge von 1000 bp bzw. 2000 bp eine Abnahme der Replikationsaktivität im Plasmid-System beobachtet. Auch das Hexamer der or6 Sequenz mit einer Länge von 1500 bp replizierte im OriP-Plasmid-System nicht mehr, die Tetramer-Sequenz mit einer Länge von 1000 bp hingegen schon (Dissertation Jeannine Gerhardt). Letztere entspricht der Länge der Sequenz der cc2 500 Dimere, die noch 2- bis 3-fache Replikationsaktivität gegenüber der Negativreferenz zeigen. Die c- Myc Sequenz mit einer Länge von 1,2 kb unterstützt die Replikation (Abb. 4.19). Das deutet darauf hin, dass möglicherweise die optimale Länge einer Sequenz, die im OriP-Plasmid-System analysiert werden kann zwischen 1,2 kb und 1,5 kb liegt.

Dies steht jedoch im Gegensatz zu den Studien aus dem Labor von M. Calos, die zeigen, dass humane Sequenzen erst ab einer Länge von 6 kb im OriP-basierten Plasmid-System effizient replizieren und die Replikationseffizienz mit der Zunahme der Länge steigt [132,133]. Zudem bleiben die Plasmide bis zu zwei Monate unter Selektion in Zellen erhalten. Es ist jedoch möglich, dass sehr lange Sequenzen eher einen Origin enthalten als kurze Sequenzen und die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, dass epigenetische Elemente innerhalb von zwei Monaten ausgebildet werden, die zur Replikationsfunktion beitragen. Dies ist möglicherweise im transienten Versuch, wie er mit den cc2 und cc4 Sequenzen durchgeführt wurde nicht der Fall.

Weiterhin ist ein Einfluss der Nukleosomen-Positionierung auf die Replikationseffizienz der untersuchten Sequenzen denkbar. Für OriP wird eine präzise Nukleosomenstruktur beobachtet, die durch Modifikationen die Origin-Aktivität stark verändern kann [248]. G4-Strukturen stellen Nukleosomen-freie Regionen dar [12]. Eine Aufhebung des G4-Motivs könnte die Nukleosomen-Positionierung und somit die Replikation des Plasmids beeinflussen.

Weitere Studien hinsichtlich der Faktoren, die auf die Replikationsfunktion im Plasmid-System einwirken und der Eigenschaften des *cis*-Elements erscheinen in Zukunft lohnenswert.

Zusammengefasst stellen die G4-Motive der cc2 500 bp Sequenz spezifische genetische Elemente dar, die die Replikation im plasmidalen Kontext auf kooperative Weise fördern. Eine Erhöhung der Anzahl potentieller G4-Strukturen hat möglicherweise einen inhibierenden Einfluss auf die Replikationseffizienz von Origins im Plasmid System.

5.2.5. Untersuchung der Assoziation von ORC und MCM2-7 an die G4-Motive der cc2 500 bp Sequenz

Eine mögliche Erklärung wie G4-Motive zur Replikationseffizienz beitragen ist, dass ORC G4-Strukturen erkennt, bindet und Replikationsursprünge markiert. Diese Hypothese stimmt mit einer Studie von Hoshina et al., (2013) darin überein, dass ORC präferentiell einzelsträngige DNA und RNA *in vitro* bindet, die G4-Motive enthalten. Die Studie von Cayrou et al., (2015) zeigt, dass die G4-Strukturen, die ca. 250 bp 5' zur Replikationsinitiationsstelle in humanen Zellen liegen Nukleosomen-freie Regionen darstellen. In *S. cerevisiae* und *D. Melanogaster* ist die ARS Konsensus-Sequenz Nukleosomen-frei bzw. die ORC-Bindung mit offenem Chromatin assoziiert [23]. In Säugerzellen hingegen sind die Initiationsstellen (IS) mit Nukleosomen assoziiert, während die G4-Strukturen 5' der IS Nukleosomen-frei sind [12]. Die Autoren postulieren, dass ORC an die Nukleosomen-freie G4-Struktur bindet, weitere pre-RC Proteine rekrutiert und ca. 250 bp 3' entfernt Replikation initiiert wird [12].

Bislang beschränkt sich die Analyse von Origins auf die Analyse von „Short-Nascent-Strands“. Diese zeigt jedoch nur die Origins, welche in der S Phase aktiviert werden. In der G1-Phase werden jedoch viel mehr Origins durch Binden des pre-RC lizenziert als in der S-Phase aktiviert werden. Es ist interessant welche Faktoren zur ORC Bindung und später zur Aktivierung beitragen. Dazu wird die Information über die ORC-Bindestellen benötigt. Die ChIP Analysen stellt hierfür die Methode der Wahl dar. Allerdings erschwert die geringe Sequenz-Spezifität von ORC zu seinen DNA-Sequenzen eine eindeutige und sensitive genomweite Analyse der Bindestellen über ChIP-Analyse. Deshalb gibt es bislang auch keine Daten, bzgl. einer Korrelation von

ORC-Bindestellen mit G4-Motiven. Die Analyse der ORC Bindung im Plasmid-System wird dadurch erleichtert, da die Plasmide in einer höheren Kopienzahl in den Zellen vorliegen als die chromosomale DNA. Dadurch wird die Detektion der ORC-Anreicherung erleichtert. Im Plasmid-System kann das G4-Motiv direkt hinsichtlich einer Assoziation mit ORC untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal überprüft, ob ORC mit den G4-Motiven interagiert und somit potentielle pre-RC Assemblierungsstellen kennzeichnet. Die Assoziation von Orc2 und Mcm3 an die G4-Motive der cc2 500 bp Sequenz wurde über ChIP Analyse im OriP-Plasmid-System untersucht. Die Analyse wurde mit Zellen durchgeführt, die vier bzw. 14 Tage nach Transfektion geerntet wurden. Nur die ChIP-Analyse des Langzeit-Experiments resultierte in einer spezifischen Anreicherung von Orc2 und Mcm3 am Positiv-Referenzloкус DS.

Ein Grund dafür ist, dass im Langzeit-Versuch die Zellen, die mit Plasmiden erfolgreich transfiziert wurden, durch Selektion angereichert werden und mehr Ausgangsmaterial für die ChIP-Analyse zur Verfügung steht. Ein weiterer Grund ist, dass sich nach 14 Tagen die Chromatiumgebung auf dem Plasmid etabliert hat und sich pre-RCs stabil ausbilden. Unterstützt wird dies mit der Studie von Zhou et al., (2005), in der gezeigt wurde, dass sich nach sechs Tagen Post-Transfektion von OriP-Plasmiden sich stabil Nukleosomen flankierend um DS positionieren und Ziel von postrationalen Modifikationen sind, deren Rolle in der Replikationsfunktion noch nicht geklärt ist.

Im Langzeit-Versuch wird keine spezifische Anreicherung von Orc2 und Mcm3 Proteinen an den G4-Motiven G4#1 und G4#2 in der cc2 500 bp Sequenz beobachtet. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die G4-Motive in cc2 500 keine direkten Bindestellen für ORC darstellen. Dies würde das Modell der direkten Assoziation von ORC mit G4-Motiven widerlegen. Jedoch sind weitere Analysen nötig, um zu verifizieren, dass die G4-Motive in der cc2 Sequenz tatsächlich G4-Strukturen ausbilden und ob sie unter den ChiP-Bedingungen stabil erhalten bleiben. Zudem ist es möglich, dass G4-Strukturen aufgrund ihrer hohen thermodynamischen Stabilität für die qPCR Analyse problematisch sind und nicht vollständig denaturiert werden können, was zu der falschen Schlussfolgerung führt, dass ORC nicht mit G4-Strukturen assoziiert. Demnach könnten noch längere Denaturierungszeiten in der qPCR getestet werden.

Eine Methode die Bildung von G4-Strukturen in der cc2 500 Sequenz zu überprüfen ist die „Circular Dichroism“ (CD-) Spektroskopie, mit der Informationen über Sekundärstrukturen von Nukleotidsequenzen erhalten werden. G4-Strukturen zeigen für verschiedene Konformationen unterschiedliche Spektren in der DC-Spektroskopie.

Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung eines Antikörpers dar, der spezifisch G4-Strukturen erkennt. Das Labor von S. Balasubramanian generierte den spezifischen anti-G4-Antikörper BG4, der hohe Affinität zu intra- und intermolekulare G4-Strukturen hat [249]. Dieser Antikörper wurde zudem erfolgreich in Immunfluoreszenz verwendet, um G4 in DNA sowie in RNA zu visualisieren [249,250]. Die Anwesenheit der G4-Motive in der cc2 500 Sequenz könnte in einer Immunpräzipitation mit dem Antikörper unter ChIP Bedingungen überprüft werden.

5.3. Modelle hinsichtlich der Rolle von G4-Strukturen in der DNA Replikation

In der Literatur werden vorwiegend Modelle für G4-Strukturen beschrieben, die die Replikation inhibieren. Cayrou al., (2015) schlagen für G4-Motive eine Rolle als molekularer Schalter bei der Aktivierung der Replikation vor. Eine Destabilisierung der G4-Strukturen in der S-Phase könnte zur Aktivierung des pre-RC beitragen. Außerdem könnten G4-Motive ein Pausieren der Replikationsmaschinerie wie bei der Transkription bewirken [12,251]. Kanoh et al., (2015) beschreiben eine Funktion von G4-Motiven in der zeitlichen Abfolge des Replikationsprozess. G4-Strukturen dienen dabei als Bindestellen für das Protein Rif1, das unter anderem in der Regulierung der Replikationsabfolge eine Rolle spielt. Dafür bindet Rif1 ein Konsensusmotiv, welches *in vitro* G4-Strukturen bildet [252]. Bei Mutation dieser G4-Motive replizieren späte Origins früh und „ruhende“ Origins werden aktiviert.

Einen stimulierenden Effekt von G4-Motiven für die DNA Replikation beschreibt das Modell, in dem ORC mit den G4-Motiven assoziiert und Replikationsursprünge markiert. Dieses Modell wird durch den Befund bestärkt, dass die Orc1 Untereinheit G4-ssDNA und -RNA *in vitro* bindet und G4-Strukturen Nukleosomen-freie Regionen

sind, die die Bindung von Proteinen an die DNA begünstigen ([12,182]. Die Replikationseffizienz von cc2 500 wird von den zwei G4-Motiven zwar positiv beeinflusst, jedoch konnte dies nicht auf eine Interaktion von ORC mit den G4-Strukturen zurückgeführt werden. Eine Hypothese für die cc2 500 Sequenz ist, dass möglicherweise weitere Proteinfaktoren bei der Erkennung von G4-Strukturen in Abhängigkeit einer weiteren *cis*-Sequenz beteiligt sind und ORC rekrutieren. Durch die indirekte Bindung über weitere Proteine wird deshalb nicht direkt an den G4-Motiven ORC detektiert. Um dieses Modell zu überprüfen, müssen die ORC-Bindestellen in der cc2 500 Sequenz identifiziert werden und dann die Assoziation in Abhängigkeit der G4-Motive untersucht werden.

Ein anderes Modell verbindet DNA und RNA G4-Strukturen mit dem Replikationsprozess [253]. Sogenannte „R-loop“ Strukturen stellen dabei einen weiteren Mechanismus dar, wie ORC an Replikationsursprünge rekrutiert wird. „R-loops“ sind Hybridstrukturen aus einer DNA- und RNA-Sequenz, welche häufig in CpG-reichen Promotor und Terminationsregionen von Genen auftreten [253]. Sie entsteht durch die Transkription eines C-reichen Stranges durch die RNA Polymerase II [253]. Die synthetisierte G-reiche RNA hybridisiert dann mit dem Templatstrang der DNA und verdrängt die nicht-Templatsequenz. Die DNA/RNA Hybridstruktur ist thermodynamisch stabiler als die DNA-Helix [254]. Durch genomweite Voraussagen für „R-Loop“ Strukturen wurde gezeigt, dass diese Strukturen verstreut im humanen Genom auftreten [255,256].

Die Bildung von G4-Strukturen ist für die einzelsträngige DNA-Sequenz der „R-Loop“ Struktur erleichtert. Genauso kann die neu transkribierte RNA G4-Strukturen ausbilden. Da ORC präferentiell ssDNA und RNA bindet, die G4-Motive haben [182], könnte ORC einerseits direkt an die freigelegte ssDNA binden oder über Bindung der RNA G4-Struktur zur „R-Loop“ Struktur rekrutiert werden [253]. Für die cc2 500 Sequenz wird dieses Modell nicht bestätigt, da keine direkte ORC-Assoziation mit den G4-Motiven beobachtet wurde. Eine Möglichkeit ist, dass RNAs in der Interaktion zwischen ORC und seinen Chaperonen (EBNA1 und HMGA1a) eine Rolle spielen und, dass G4-Motive hier eine Bedeutung haben.

EBER1 wurde in dieser Arbeit als erste spezifische RNA ermittelt, die die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC *in vitro* vermittelt. Die EBER-RNAs sind für die Replikation des EBV-Genoms nicht essentiell, da eine Deletion in EBV-positiven Zellen keinen Effekt auf die Replikation des EBV-Genoms zeigte. Es wurde nicht

überprüft, ob ORC an EBER1 in Abhängigkeit der G4-Motive bindet. Ob EBER1 eine Rolle in der Erkennung von zellulären „R-Loop“ Strukturen spielt ist bisher nicht bekannt. Eine Analyse hinsichtlich ORC- und Chaperon-assoziiierter RNAs könnte Aufschluss über jeweils die RNA-Spezies geben, die unter dem Aspekt von „R loops“ bzw. in der Chaperon Interaktion eine Rolle spielen und an der Selektion von Replikationsursprüngen beteiligt sind.

6. Zusammenfassung

6.1. Zusammenfassung

Die Duplikation des Genoms beginnt an den Replikationsursprüngen (Origins) die durch der Bildung des Prä-Replikationskomplex (pre-RC) als replikations-kompetent markiert werden. Das initiale Binden des hexameren Origin-Erkennungs-Komplex (ORC) ist der erste Schritt zur Bildung des pre-RC.

Die Verteilung der Origins auf dem Genom ist sehr flexibel, aber nicht zufällig und ist von vielen Faktoren des Chromatins abhängig. Unter anderem werden in jüngster Zeit die von Guanin-reichen Nukleotidsequenzen ausgebildeten viersträngigen helikalen G-Quadruplex (G4) Strukturen mit der Selektion und Effizienz von Replikationsursprüngen in Verbindung gebracht.

Diese Arbeit hatte das Ziel diese Verbindung näher zu untersuchen. Dazu wurde ein Replikations-System basierend auf dem gut charakterisierten Replikationsursprung des Epstein-Barr Virus (EBV), OriP, verwendet. OriP vermittelt während der latenten EBV Infektion die extrachromosomale Replikation des viralen Genoms. Dieser Prozess ist abhängig vom viralen Protein EBNA1, das ORC an OriP rekrutiert. Es wurde gezeigt, dass die ORC-EBNA1 Interaktion über RNAs vermittelt wird [117].

Ein Ziel dieser Arbeit war es, spezifische RNAs für die Interaktion von ORC mit EBNA1 zu identifizieren und zu charakterisieren. Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation (RIP) aus EBV-positiven Raji Zellen identifizierten EBER1 und EBER2 als EBNA1-spezifische virale RNAs. Aus *in vitro* ORC „pull-down“ Experimenten ging EBER1 als spezifische RNA hervor, die die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC vermittelt. Mutationsanalysen von EBER1 mit anschließenden Electromobility Shift Assays zeigten, dass EBNA1 präferentiell die „Stem-Loop“ Strukturen der EBER1 bindet und dass die zwei G4-Motive in EBER1 für die Interaktion nicht notwendig sind. Eine 100 b Sequenz von EBER1 mit drei „Stem-Loop“ Strukturen wurde als Interaktionsdomäne identifiziert.

Für die Identifizierung von zellulären EBNA1-spezifischen RNAs wurde die Methode der Ribonukleoprotein-Immunpräzipitation aus Raji Zellen anhand eines RNase T1 Verdaus des immunpräzipitierten EBNA1-EBER1 Komplex optimiert. Die nicht-

kodierenden zellulären RNAs RNU1 und RNU2 wurden als mögliche Interaktionspartner für EBNA1 identifiziert.

In vitro wird die Interaktion zwischen ORC und EBNA1 durch G4-RNA vermittelt [166]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von RNA G4-Strukturen auf die Replikation des EBV-Genoms untersucht. Dafür wurden Raji Zellen mit dem G4-bindenden Inhibitor TmPyP4 behandelt und die relative EBV-Kopienzahl sowie die Ausbildung des pre-RC an OriP untersucht. Sowohl die virale Replikation als auch die Ausbildung des pre-RC wurde in Anwesenheit von TmPyP4 nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass entweder TmPyP4 nicht selektiv an den für die EBNA1-ORC Interaktion relevanten RNA G4-Strukturen *in vivo* bindet oder G4-Strukturen keine Rolle für die EBNA1-ORC Interaktion an OriP spielen.

Um den Einfluss von DNA G4-Strukturen auf die Effizienz von Replikationsursprüngen zu untersuchen, wurden zwei potentielle Origin Sequenzen aus dem Maus-Genom, cc2 und cc4 im OriP Plasmid-System untersucht. Die Replikationsfunktion wurde auf je eine 500 bp große Sequenz zurückgeführt. Mutationsanalysen hinsichtlich der zwei G4-Motive in der cc2 500 Sequenz zeigten, dass beide G4-Motive kooperativ zur Replikationsfunktion beitragen. Eine 330 bp Sequenz des cc2 mit beiden G4-Motiven replizierte jedoch weniger effizient als die 500 bp Sequenz, was darauf hindeutet, dass ein weiteres Element in *cis* zur Replikationseffizienz der cc2 Sequenz beiträgt. Die Multimerisierung der cc2 500 Sequenz bewirkte eine Abnahme der Effizienz, was darauf hinweist dass G4-Strukturen auch einen inhibierenden Effekt auf die DNA-Replikationsmaschinerie ausüben.

Zur Untersuchung einer möglichen Assoziation von ORC mit DNA G4-Strukturen wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt. ORC und Proteine des pre-RCs wurden nicht im Zusammenhang mit den G4-Motiven der cc2 500 Sequenz detektiert. Das deutet darauf hin, dass die G4-Motive in der cc2 500 Sequenz keine direkten Bindestellen für ORC darstellen. Ob die Ergebnisse für den genomischen Kontext zutreffen und welcher Mechanismus bei der Regulierung der Replikationseffizienz über G4-Motive zu Grunde liegt, muss noch in weiteren Studien mittels weiterer Mutations- und ChIP-Analysen bestimmt werden.

6.2. Summary

Duplication of the genome starts at loci (called replication origins) that are marked as replication-competent by the formation of a pre recognition complex (pre-RC), the first step in the process being the binding of the hexameric origin recognition complex (ORC).

The distribution of origins across the genome and their activation is flexible but not random and depends on several characteristics of the chromatin. In recent years G-quadruplex (G4) structures that are formed by guanine-rich nucleotide sequences have been increasingly brought into association with the selection as well as efficiency of replication origins. This work aimed at achieving a closer understanding of this association. For this purpose a replication system based on OriP, the well characterized origin of replication of the Epstein-Barr virus (EBV) was utilized. OriP mediates the extrachromosomal replication of the viral genome during the latent phase of EBV infection. This process is dependent on the viral protein EBNA1. EBNA1 recruits ORC on OriP in a process that has been demonstrated to be mediated by RNAs [117].

An aim of this work was to identify and characterize RNAs that mediate the interaction between ORC and EBNA1. Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (RIP) studies on the EBV-positive Raji cell line identified EBER1 and EBER2 as EBNA1-specific viral RNAs. *In vitro* ORC pull-down assays established EBER1 as a specific RNA mediating the interaction between EBNA1 and ORC. Mutation analysis of EBER1 in combination with electromobility shift assays showed that EBNA1 preferentially binds stem-loop structures in EBER1 and that G4 motifs in EBER1 are not required for this binding. A 100 b sequence in EBER1 with three stem-loop structures was identified as the interaction domain.

For the purpose of identifying EBNA1-specific cellular RNAs, an RIP method was optimized with regard to RNase T1 digestion of immunoprecipitated EBNA1-EBER1 complexes from Raji cells. The non-coding cellular RNAs RNU1 and RNU2 were identified as potential EBNA1 interaction partners.

The *in vitro* interaction between ORC and EBNA1 has previously been reported to be mediated by G4-RNA [166]. In this work the influence of RNA G4 structures on the replication of the EBV genome was investigated. For that purpose Raji cells treated with the G4-binding inhibitory molecule TmPyP4 were studied for relative EBV copy

numbers as well as for the formation of pre-RC at OriP. TmPyP4 did not affect viral replication nor did it influence the interaction of EBNA1 with ORC at OriP, indicating either that TmPyP4 does not bind *in vivo* with RNA G4 structures relevant for EBNA1-ORC interaction or that G4 structures do not play a role in the EBNA1-OriP interaction.

In order to understand the effect of DNA G4-structures on the efficiency of replication origins, two potential origin sequences cc2 and cc4 from the mouse genome were investigated for their replication activity in the OriP plasmid system. The replication function of both sequences could be traced to a 500 bp sequence each. Mutation analysis revealed that the two G4 motifs in the cc2 sequence co-operate to increase replication efficiency. However a 300 bp sequence of cc2 that contained both G4 motifs was less efficient in the replication assay suggesting that a further *cis*-element contributes to the replication efficiency of the cc2 sequence. Multimerisation of the cc2 500 bp sequence caused a reduction in the replication efficiency suggesting that G4structures can also exert an inhibitory effect on the replication machinery.

ChIP analyses were employed for investigating whether ORC associates with DNA G4 structures and whether such association marks replication origins. These analyses showed no association between ORC and pre-RC proteins with the G4 motifs of the cc2 500 bp sequence indicating that G4 motifs in the cc2 sequence are not direct binding sites for ORC. Whether these findings are applicable in the genomic context and what mechanism are involved in the regulation of replication efficiency through G4 motifs needs to be established through further studies involving mutation analyses and ChIP.

7. Abkürzungsverzeichnis

Å	zu jeweils
Abb.	Abbildung
a. d.	autoklaviert und destilliert
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cDNA	„complementary“ DNA, Komplementär DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Cp	C-Promotor
CTP	Cytosintriphosphat
DHRF	Dehydrofolat Reduktase-Gen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS-Element	„dyad symmetry“ Element
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBER	EBV-encoded RNA
EBNA	„Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen“
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
FA	Formaldehyd
FACS	„Fluorescence-activated cell sorting“
FCS	Fötales Kälberserum
FR-Element	family of repeats“ Element
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G4	G-Quadruplex
HMGA	„High mobility group“
H ₂ O	Wasser
HP1	Heterochromatin Protein 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Kernextrakt
LCL	„lymphoblastoid cell line“ lymphoblastoide Zelllinie
LB	Luria Bertani
M	molar
m	milli
mA	Milliampere
MCM-Proteine	„mini chromosome maintenance“-Proteine
Min.	Minute
mind.	mindestens
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	nano
ncRNA	nicht-kodierende („non-coding“) RNA
nm	Nanometer
ORC	„Origin Recognition Complex“
OriP	„origin of plasmid replication“ Latenter Replikationsursprung in EBV
OriLyt	Lytischer Replikationsursprung in EBV
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS + Tween 1%
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PI	Propidium-Iodid
pre-RC	Prä-Replikationskomplex
Qp	Q-Promoter
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Sek.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssDNA	„single stranded“ (einzelsträngige) DNA
Std.	Stunde(n)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TetO	Tetrazyklin Operatoren
tRNA	Transfer-RNA
U	„Units“, Einheiten

Abkürzungsverzeichnis

ÜS	Überstand
V	Volt
Verd.	Verdünnung
Vol.	Volumen
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta
μ	mikro
°C	Grad Celsius

Referenzen

1. Dahm R (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol* 278: 274-288.
2. Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med* 79: 137-158.
3. Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
4. Nelson DL (2016) *Lehninger principles of biochemistry*. New York, NY: W. H. Freeman. pages cm p.
5. Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, Vorlickova M (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res* 37: 1713-1725.
6. Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet* 13: 770-780.
7. Pierce BA (2016) *Genetics : a conceptual approach*. New York, NY: W. H. Freeman and Co. pages cm p.
8. (!!! INVALID CITATION !!!).
9. Stillman B (2015) Reconsidering DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. *Mol Cell* 59: 139-141.
10. Huberman JA, Riggs AD (1966) Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55: 599-606.
11. Besnard E, Babled A, Lapasset L, Milhavet O, Parrinello H, et al. (2012) Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol* 19: 837-844.
12. Cayrou C, Ballester B, Peiffer I, Fenouil R, Coulombe P, et al. (2015) The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res*.
13. Picard F, Cadoret JC, Audit B, Arneodo A, Alberti A, et al. (2014) The spatiotemporal program of DNA replication is associated with specific combinations of chromatin marks in human cells. *PLoS Genet* 10: e1004282.
14. Cayrou C, Coulombe P, Puy A, Rialle S, Kaplan N, et al. (2012) New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* 11: 658-667.
15. Heichinger C, Penkett CJ, Bahler J, Nurse P (2006) Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *Embo j* 25: 5171-5179.
16. Friedman KL, Brewer BJ, Fangman WL (1997) Replication profile of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI. *Genes Cells* 2: 667-678.
17. Ge XQ, Jackson DA, Blow JJ (2007) Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* 21: 3331-3341.
18. Chen YH, Jones MJ, Yin Y, Crist SB, Colnaghi L, et al. (2015) ATR-mediated phosphorylation of FANCI regulates dormant origin firing in response to replication stress. *Mol Cell* 58: 323-338.
19. McIntosh D, Blow JJ (2012) Dormant origins, the licensing checkpoint, and the response to replicative stresses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
20. Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71: 333-374.

21. Mendez J, Stillman B (2003) Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays* 25: 1158-1167.
22. Bowers JL, Randell JC, Chen S, Bell SP (2004) ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell* 16: 967-978.
23. Fragkos M, Ganier O, Coulombe P, Mechali M (2015) DNA replication origin activation in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 360-374.
24. Sclafani RA, Holzen TM (2007) Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* 41: 237-280.
25. Labib K (2010) How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev* 24: 1208-1219.
26. Yeeles JT, Deegan TD, Janska A, Early A, Diffley JF (2015) Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* 519: 431-435.
27. Jacob F, Brenner S (1963) [On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 256: 298-300.
28. Rajewska M, Wegrzyn K, Konieczny I (2012) AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev* 36: 408-434.
29. Hsiao CL, Carbon J (1979) High-frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG4 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3829-3833.
30. Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW (1979) Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-43.
31. Huang RY, Kowalski D (1996) Multiple DNA elements in ARS305 determine replication origin activity in a yeast chromosome. *Nucleic Acids Res* 24: 816-823.
32. Marahrens Y, Stillman B (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* 255: 817-823.
33. Van Houten JV, Newlon CS (1990) Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome III. *Mol Cell Biol* 10: 3917-3925.
34. Breier AM, Chatterji S, Cozzarelli NR (2004) Prediction of *Saccharomyces cerevisiae* replication origins. *Genome Biol* 5: R22.
35. Celniker SE, Sweder K, Srienc F, Bailey JE, Campbell JL (1984) Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4: 2455-2466.
36. Huang RY, Kowalski D (1993) A DNA unwinding element and an ARS consensus comprise a replication origin within a yeast chromosome. *Embo j* 12: 4521-4531.
37. Rao H, Stillman B (1995) The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2224-2228.
38. Wilmes GM, Bell SP (2002) The B2 element of the *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 origin of replication requires specific sequences to facilitate pre-RC formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 101-106.
39. Maundrell K, Hutchison A, Shall S (1988) Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *Embo j* 7: 2203-2209.
40. Okuno Y, Okazaki T, Masukata H (1997) Identification of a predominant replication origin in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 25: 530-537.
41. Okuno Y, Satoh H, Sekiguchi M, Masukata H (1999) Clustered adenine/thymine

- stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol Cell Biol* 19: 6699-6709.
42. Cotobal C, Segurado M, Antequera F (2010) Structural diversity and dynamics of genomic replication origins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo j* 29: 934-942.
 43. Dai J, Chuang RY, Kelly TJ (2005) DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 337-342.
 44. Chuang RY, Kelly TJ (1999) The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2656-2661.
 45. Abdurashidova G, Deganuto M, Klima R, Riva S, Biamonti G, et al. (2000) Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science* 287: 2023-2026.
 46. Dijkwel PA, Wang S, Hamlin JL (2002) Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies. *Mol Cell Biol* 22: 3053-3065.
 47. Paixao S, Colaluca IN, Cubells M, Peverali FA, Destro A, et al. (2004) Modular structure of the human lamin B2 replicator. *Mol Cell Biol* 24: 2958-2967.
 48. Vaughn JP, Dijkwel PA, Hamlin JL (1990) Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell* 61: 1075-1087.
 49. Remus D, Beall EL, Botchan MR (2004) DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *Embo j* 23: 897-907.
 50. Vashee S, Cvetic C, Lu W, Simancek P, Kelly TJ, et al. (2003) Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev* 17: 1894-1908.
 51. Hyrien O (2015) Peaks cloaked in the mist: the landscape of mammalian replication origins. *J Cell Biol* 208: 147-160.
 52. Bielinsky AK, Gerbi SA (1998) Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast *ARS1* origin. *Science* 279: 95-98.
 53. Unnikrishnan A, Gafken PR, Tsukiyama T (2010) Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* 17: 430-437.
 54. Tardat M, Brustel J, Kirsh O, Lefebvre C, Callanan M, et al. (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 12: 1086-1093.
 55. Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson SC, Mann M, et al. (2010) Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* 143: 470-484.
 56. Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, Marks H, Denissov S, et al. (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142: 967-980.
 57. Ladenburger EM, Keller C, Knippers R (2002) Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. *Mol Cell Biol* 22: 1036-1048.
 58. MacAlpine DM, Rodriguez HK, Bell SP (2004) Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev* 18: 3094-3105.
 59. Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25: 1010-1022.
 60. Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo j* 17: 2426-2435.
 61. Prioleau MN (2009) CpG islands: starting blocks for replication and transcription.

- PLoS Genet 5: e1000454.
62. Sequeira-Mendes J, Diaz-Uriarte R, Apedaile A, Huntley D, Brockdorff N, et al. (2009) Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. *PLoS Genet* 5: e1000446.
 63. Cayrou C, Coulombe P, Vigneron A, Stanojcic S, Ganier O, et al. (2011) Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res* 21: 1438-1449.
 64. Collart C, Christov CP, Smith JC, Krude T (2011) The midblastula transition defines the onset of Y RNA-dependent DNA replication in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 31: 3857-3870.
 65. Zhang AT, Langley AR, Christov CP, Kheir E, Shafee T, et al. (2011) Dynamic interaction of Y RNAs with chromatin and initiation proteins during human DNA replication. *J Cell Sci* 124: 2058-2069.
 66. Christov CP, Gardiner TJ, Szuts D, Krude T (2006) Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* 26: 6993-7004.
 67. Gomez M, Brockdorff N (2004) Heterochromatin on the inactive X chromosome delays replication timing without affecting origin usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6923-6928.
 68. Valton AL, Hassan-Zadeh V, Lema I, Boggetto N, Alberti P, et al. (2014) G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators. *Embo j* 33: 732-746.
 69. Beall EL, Manak JR, Zhou S, Bell M, Lipsick JS, et al. (2002) Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication. *Nature* 420: 833-837.
 70. Bosco G, Du W, Orr-Weaver TL (2001) DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol* 3: 289-295.
 71. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, et al. (2007) Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448: 445-451.
 72. Georlette D, Ahn S, MacAlpine DM, Cheung E, Lewis PW, et al. (2007) Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the *Drosophila* Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells. *Genes Dev* 21: 2880-2896.
 73. Pak DT, Pflumm M, Chesnokov I, Huang DW, Kellum R, et al. (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91: 311-323.
 74. Thomae AW, Pich D, Brocher J, Spindler MP, Berens C, et al. (2008) Interaction between HMGA1a and the origin recognition complex creates site-specific replication origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1692-1697.
 75. Prasanth SG, Shen Z, Prasanth KV, Stillman B (2010) Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15093-15098.
 76. Muller P, Park S, Shor E, Huebert DJ, Warren CL, et al. (2010) The conserved bromo-adjacent homology domain of yeast Orc1 functions in the selection of DNA replication origins within chromatin. *Genes Dev* 24: 1418-1433.
 77. Stedman W, Deng Z, Lu F, Lieberman PM (2004) ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. *J Virol* 78: 12566-12575.
 78. Adams A (1987) Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. *J*

- Virol 61: 1743-1746.
79. Dyson PJ, Farrell PJ (1985) Chromatin structure of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 9): 1931-1940.
 80. Klinke O, Feederle R, Delecluse HJ (2014) Genetics of Epstein-Barr virus microRNAs. *Semin Cancer Biol* 26: 52-59.
 81. Speck SH, Ganem D (2010) Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell Host Microbe* 8: 100-115.
 82. Thorley-Lawson DA (2015) EBV Persistence-Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 390: 151-209.
 83. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3806-3810.
 84. Reisman D, Yates J, Sugden B (1985) A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol Cell Biol* 5: 1822-1832.
 85. Rawlins DR, Milman G, Hayward SD, Hayward GS (1985) Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42: 859-868.
 86. Koons MD, Van Scoy S, Hearing J (2001) The replicator of the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication, oriP, is composed of multiple functional elements. *J Virol* 75: 10582-10592.
 87. Lindner SE, Zeller K, Schepers A, Sugden B (2008) The affinity of EBNA1 for its origin of DNA synthesis is a determinant of the origin's replicative efficiency. *J Virol* 82: 5693-5702.
 88. Yates JL, Guan N (1991) Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* 65: 483-488.
 89. Chaudhuri B, Xu H, Todorov I, Dutta A, Yates JL (2001) Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10085-10089.
 90. Dhar SK, Yoshida K, Machida Y, Khaira P, Chaudhuri B, et al. (2001) Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* 106: 287-296.
 91. Schepers A, Ritzi M, Bousset K, Kremmer E, Yates JL, et al. (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo j* 20: 4588-4602.
 92. Harrison S, Fisenne K, Hearing J (1994) Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J Virol* 68: 1913-1925.
 93. Wysokenski DA, Yates JL (1989) Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol* 63: 2657-2666.
 94. Yates JL, Camiolo SM, Bashaw JM (2000) The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol* 74: 4512-4522.
 95. Papior P, Arteaga-Salas JM, Gunther T, Grundhoff A, Schepers A (2012) Open chromatin structures regulate the efficiencies of pre-RC formation and replication initiation in Epstein-Barr virus. *J Cell Biol* 198: 509-528.
 96. Little RD, Schildkraut CL (1995) Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin. *Mol Cell Biol* 15: 2893-2903.
 97. Norio P, Schildkraut CL, Yates JL (2000) Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J Virol* 74: 8563-8574.

98. Frappier L (2012) The Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein. *Scientifica* (Cairo) 2012: 438204.
99. Yates JL, Warren N, Sugden B (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313: 812-815.
100. Aiyar A, Tyree C, Sugden B (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo j* 17: 6394-6403.
101. Hung SC, Kang MS, Kieff E (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1865-1870.
102. Kanda T, Otter M, Wahl GM (2001) Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in epstein-barr virus-based plasmids. *Mol Cell Biol* 21: 3576-3588.
103. Kirchmaier AL, Sugden B (1995) Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol* 69: 1280-1283.
104. Lee MA, Diamond ME, Yates JL (1999) Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol* 73: 2974-2982.
105. Kapoor P, Frappier L (2003) EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *J Virol* 77: 6946-6956.
106. Leight ER, Sugden B (2000) EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 10: 83-100.
107. Mackey D, Sugden B (1999) The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. *Mol Cell Biol* 19: 3349-3359.
108. Marechal V, Dehee A, Chikhi-Brachet R, Piolot T, Coppey-Moisan M, et al. (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* 73: 4385-4392.
109. Avolio-Hunter TM, Frappier L (2003) EBNA1 efficiently assembles on chromatin containing the Epstein-Barr virus latent origin of replication. *Virology* 315: 398-408.
110. Gerhardt J, Jafar S, Spindler MP, Ott E, Schepers A (2006) Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay. *Mol Cell Biol* 26: 7731-7746.
111. Ito S, Gotoh E, Ozawa S, Yanagi K (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with interphase chromatin and its newly replicated regions in particular. *J Gen Virol* 83: 2377-2383.
112. Coppotelli G, Mughal N, Callegari S, Sompallae R, Caja L, et al. (2013) The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 reprograms transcription by mimicry of high mobility group A proteins. *Nucleic Acids Res* 41: 2950-2962.
113. Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, et al. (1997) The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4: 657-665.
114. Reeves R (2010) Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Acta* 1799: 3-14.
115. Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265: 8573-8582.
116. Sears J, Ujihara M, Wong S, Ott C, Middeldorp J, et al. (2004) The amino terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 contains AT hooks that

- facilitate the replication and partitioning of latent EBV genomes by tethering them to cellular chromosomes. *J Virol* 78: 11487-11505.
117. Norseen J, Thomae A, Sridharan V, Aiyar A, Schepers A, et al. (2008) RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex. *Embo j* 27: 3024-3035.
 118. Thomae AW, Baltin J, Pich D, Deutsch MJ, Ravasz M, et al. (2011) Different roles of the human Orc6 protein in the replication initiation process. *Cell Mol Life Sci* 68: 3741-3756.
 119. Glickman JN, Howe JG, Steitz JA (1988) Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 62: 902-911.
 120. Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA (1981) Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 805-809.
 121. Rosa MD, Gottlieb E, Lerner MR, Steitz JA (1981) Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAIL. *Mol Cell Biol* 1: 785-796.
 122. Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K (1999) Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 73: 9827-9831.
 123. Ruf IK, Rhyne PW, Yang C, Cleveland JL, Sample JT (2000) Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis. *J Virol* 74: 10223-10228.
 124. Yajima M, Kanda T, Takada K (2005) Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 79: 4298-4307.
 125. Gregorovic G, Bosshard R, Karstegl CE, White RE, Pattle S, et al. (2011) Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 85: 3535-3545.
 126. Gregorovic G, Boulden EA, Bosshard R, Elgueta Karstegl C, Skalsky R, et al. (2015) Epstein-Barr Viruses (EBVs) Deficient in EBV-Encoded RNAs Have Higher Levels of Latent Membrane Protein 2 RNA Expression in Lymphoblastoid Cell Lines and Efficiently Establish Persistent Infections in Humanized Mice. *J Virol* 89: 11711-11714.
 127. Swaminathan S, Tomkinson B, Kieff E (1991) Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1546-1550.
 128. Lee N, Pimienta G, Steitz JA (2012) AUF1/hnRNP D is a novel protein partner of the EBER1 noncoding RNA of Epstein-Barr virus. *Rna* 18: 2073-2082.
 129. Toczyski DP, Matera AG, Ward DC, Steitz JA (1994) The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3463-3467.
 130. Lu CC, Wu CW, Chang SC, Chen TY, Hu CR, et al. (2004) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a DNA-binding protein with strong RNA-binding activity. *J Gen Virol* 85: 2755-2765.
 131. Snudden DK, Hearing J, Smith PR, Grasser FA, Griffin BE (1994) EBNA-1, the major nuclear antigen of Epstein-Barr virus, resembles 'RGG' RNA binding proteins. *Embo j* 13: 4840-4847.
 132. Heinzl SS, Krysan PJ, Tran CT, Calos MP (1991) Autonomous DNA replication

- in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol* 11: 2263-2272.
133. Krysan PJ, Haase SB, Calos MP (1989) Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Mol Cell Biol* 9: 1026-1033.
 134. Biamonti G, Della Valle G, Talarico D, Cobianchi F, Riva S, et al. (1985) Fate of exogenous recombinant plasmids introduced into mouse and human cells. *Nucleic Acids Res* 13: 5545-5561.
 135. Sen D, Gilbert W (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334: 364-366.
 136. Sundquist WI, Klug A (1989) Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342: 825-829.
 137. Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR (1989) Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* 59: 871-880.
 138. Huppert JL (2010) Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *Febs j* 277: 3452-3458.
 139. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res* 34: 5402-5415.
 140. Parkinson GN, Lee MP, Neidle S (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 417: 876-880.
 141. Phan AT, Kuryavyi V, Luu KN, Patel DJ (2007) Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res* 35: 6517-6525.
 142. Tarsounas M, Tijsterman M (2013) Genomes and G-quadruplexes: for better or for worse. *J Mol Biol* 425: 4782-4789.
 143. Gellert M, Lipsett MN, Davies DR (1962) Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 2013-2018.
 144. Sen D, Gilbert W (1990) A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* 344: 410-414.
 145. Patel DJ, Phan AT, Kuryavyi V (2007) Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res* 35: 7429-7455.
 146. Huppert JL, Balasubramanian S (2005) Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res* 33: 2908-2916.
 147. Todd AK, Johnston M, Neidle S (2005) Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res* 33: 2901-2907.
 148. Gilbert N, Allan J (2014) Supercoiling in DNA and chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 25: 15-21.
 149. Sun D, Hurley LH (2009) The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G-quadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression. *J Med Chem* 52: 2863-2874.
 150. Brooks TA, Kendrick S, Hurley L (2010) Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *Febs j* 277: 3459-3469.
 151. Rhodes D, Lipps HJ (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res* 43: 8627-8637.
 152. Cahoon LA, Seifert HS (2013) Transcription of a cis-acting, noncoding, small RNA is required for pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS Pathog* 9: e1003074.
 153. De S, Michor F (2011) DNA secondary structures and epigenetic determinants of cancer genome evolution. *Nat Struct Mol Biol* 18: 950-955.

154. Hershman SG, Chen Q, Lee JY, Kozak ML, Yue P, et al. (2008) Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 36: 144-156.
155. Chavez A, Tsou AM, Johnson FB (2009) Telomeres do the (un)twist: helicase actions at chromosome termini. *Biochim Biophys Acta* 1792: 329-340.
156. Mohaghegh P, Karow JK, Brosh RM, Jr., Bohr VA, Hickson ID (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* 29: 2843-2849.
157. Schulz VP, Zakian VA, Ogburn CE, McKay J, Jarzebowicz AA, et al. (1996) Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum Genet* 97: 750-754.
158. Huppert JL, Balasubramanian S (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 35: 406-413.
159. Eddy J, Maizels N (2006) Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 34: 3887-3896.
160. Lutz W, Leon J, Eilers M (2002) Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1602: 61-71.
161. Pelengaris S, Khan M, Evan GI (2002) Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109: 321-334.
162. Simonsson T, Pecinka P, Kubista M (1998) DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Res* 26: 1167-1172.
163. Grand CL, Han H, Munoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, et al. (2002) The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* 1: 565-573.
164. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11593-11598.
165. Cayrou C, Gregoire D, Coulombe P, Danis E, Mechali M (2012) Genome-scale identification of active DNA replication origins. *Methods* 57: 158-164.
166. Norseen J, Johnson FB, Lieberman PM (2009) Role for G-quadruplex RNA binding by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in DNA replication and metaphase chromosome attachment. *J Virol* 83: 10336-10346.
167. Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
168. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
169. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
170. Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1: 581-585.
171. Kiledjian M, Dreyfuss G (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo j* 11: 2655-2664.
172. Snudden DK, Smith PR, Lai D, Ng MH, Griffin BE (1995) Alterations in the structure of the EBV nuclear antigen, EBNA1, in epithelial cell tumours. *Oncogene* 10: 1545-1552.
173. Izbic E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, et al. (1999) Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in

- human tumor cells. *Cancer Res* 59: 639-644.
174. Liu W, Sun D, Hurley LH (2005) Binding of G-quadruplex-interactive agents to distinct G-quadruplexes induces different biological effects in MiaPaCa cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 24: 1801-1815.
 175. Mikami-Terao Y, Akiyama M, Yuza Y, Yanagisawa T, Yamada O, et al. (2008) Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 in K562 leukemic cells. *Cancer Lett* 261: 226-234.
 176. Rha SY, Izbicka E, Lawrence R, Davidson K, Sun D, et al. (2000) Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines. *Clin Cancer Res* 6: 987-993.
 177. Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, et al. (2004) Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 802-808.
 178. Monchaud D, Teulade-Fichou MP (2008) A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem* 6: 627-636.
 179. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubock R, Hofacker IL (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 36: W70-74.
 180. Lorenz R, Bernhart SH, Honer Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, et al. (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol* 6: 26.
 181. Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS (2006) QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 34: W676-682.
 182. Hoshina S, Yura K, Teranishi H, Kiyasu N, Tominaga A, et al. (2013) Human origin recognition complex binds preferentially to G-quadruplex-preferable RNA and single-stranded DNA. *J Biol Chem* 288: 30161-30171.
 183. Mayer CE, Geerlof A, Schepers A (2012) Efficient expression and purification of tag-free Epstein-Barr virus EBNA1 protein in *Escherichia coli* by auto-induction. *Protein Expr Purif* 86: 7-11.
 184. Vogel B, Loschberger A, Sauer M, Hock R (2011) Cross-linking of DNA through HMGA1 suggests a DNA scaffold. *Nucleic Acids Res* 39: 7124-7133.
 185. Ritzi M, Tillack K, Gerhardt J, Ott E, Humme S, et al. (2003) Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci* 116: 3971-3984.
 186. Kanda T, Kamiya M, Maruo S, Iwakiri D, Takada K (2007) Symmetrical localization of extrachromosomally replicating viral genomes on sister chromatids. *J Cell Sci* 120: 1529-1539.
 187. Ott E, Norio P, Ritzi M, Schildkraut C, Schepers A (2011) The dyad symmetry element of Epstein-Barr virus is a dominant but dispensable replication origin. *PLoS One* 6: e18609.
 188. Berberich S, Trivedi A, Daniel DC, Johnson EM, Leffak M (1995) In vitro replication of plasmids containing human c-myc DNA. *J Mol Biol* 245: 92-109.
 189. Liu G, Malott M, Leffak M (2003) Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator. *Mol Cell Biol* 23: 1832-1842.
 190. Malott M, Leffak M (1999) Activity of the c-myc replicator at an ectopic chromosomal location. *Mol Cell Biol* 19: 5685-5695.
 191. McWhinney C, Leffak M (1990) Autonomous replication of a DNA fragment containing the chromosomal replication origin of the human c-myc gene. *Nucleic Acids Res* 18: 1233-1242.
 192. Trivedi A, Waltz SE, Kamath S, Leffak M (1998) Multiple initiations in the c-myc replication origin independent of chromosomal location. *DNA Cell Biol* 17: 885-896.

193. Leonard AC, Mechali M (2013) DNA replication origins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a010116.
194. Cadoret JC, Meisch F, Hassan-Zadeh V, Luyten I, Guillet C, et al. (2008) Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15837-15842.
195. Costas C, de la Paz Sanchez M, Stroud H, Yu Y, Oliveros JC, et al. (2011) Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat Struct Mol Biol* 18: 395-400.
196. Millevoi S, Moine H, Vagner S (2012) G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3: 495-507.
197. Paeschke K, Capra JA, Zakian VA (2011) DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell* 145: 678-691.
198. Moore MJ, Schultes CM, Cuesta J, Cuenca F, Gunaratnam M, et al. (2006) Trisubstituted acridines as G-quadruplex telomere targeting agents. Effects of extensions of the 3,6- and 9-side chains on quadruplex binding, telomerase activity, and cell proliferation. *J Med Chem* 49: 582-599.
199. Phan AT, Kuryavyi V, Gaw HY, Patel DJ (2005) Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat Chem Biol* 1: 167-173.
200. Parkinson GN, Ghosh R, Neidle S (2007) Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry* 46: 2390-2397.
201. Morris MJ, Wingate KL, Silwal J, Leeper TC, Basu S (2012) The porphyrin TmPyP4 unfolds the extremely stable G-quadruplex in MT3-MMP mRNA and alleviates its repressive effect to enhance translation in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* 40: 4137-4145.
202. Zamiri B, Reddy K, Macgregor RB, Jr., Pearson CE (2014) TMPyP4 porphyrin distorts RNA G-quadruplex structures of the disease-associated r(GGGGCC)_n repeat of the C9orf72 gene and blocks interaction of RNA-binding proteins. *J Biol Chem* 289: 4653-4659.
203. Weisman-Shomer P, Cohen E, Hershcovitz I, Khateb S, Wolfowitz-Barchad O, et al. (2003) The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)_n. *Nucleic Acids Res* 31: 3963-3970.
204. Boncina M, Podlipnik C, Piantanida I, Eilmes J, Teulade-Fichou MP, et al. (2015) Thermodynamic fingerprints of ligand binding to human telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res* 43: 10376-10386.
205. De Cian A, Guittat L, Shin-ya K, Riou JF, Mergny JL (2005) Affinity and selectivity of G4 ligands measured by FRET. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 235-236.
206. Monchaud D, Allain C, Teulade-Fichou MP (2006) Development of a fluorescent intercalator displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 4842-4845.
207. Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, Hurley LH (2003) The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer Res* 63: 3247-3256.
208. Madireddy A, Purushothaman P, Loosbroock CP, Robertson ES, Schildkraut CL, et al. (2016) G-quadruplex-interacting compounds alter latent DNA replication and episomal persistence of KSHV. *Nucleic Acids Res*.

209. Woodward AM, Gohler T, Luciani MG, Oehlmann M, Ge X, et al. (2006) Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J Cell Biol* 173: 673-683.
210. Verma SC, Choudhuri T, Robertson ES (2007) The minimal replicator element of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus terminal repeat supports replication in a semiconservative and cell-cycle-dependent manner. *J Virol* 81: 3402-3413.
211. Skalsky RL, Hu J, Renne R (2007) Analysis of viral cis elements conferring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus episome partitioning and maintenance. *J Virol* 81: 9825-9837.
212. Hong M, Murai Y, Kutsuna T, Takahashi H, Nomoto K, et al. (2006) Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by RNA interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 1-8.
213. Kennedy G, Komano J, Sugden B (2003) Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14269-14274.
214. Yin Q, Flemington EK (2006) siRNAs against the Epstein Barr virus latency replication factor, EBNA1, inhibit its function and growth of EBV-dependent tumor cells. *Virology* 346: 385-393.
215. Altmann M, Pich D, Ruiss R, Wang J, Sugden B, et al. (2006) Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14188-14193.
216. Humme S, Reisbach G, Feederle R, Delecluse HJ, Bousset K, et al. (2003) The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10989-10994.
217. Gahn TA, Sugden B (1995) An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J Virol* 69: 2633-2636.
218. Reisman D, Sugden B (1986) trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol Cell Biol* 6: 3838-3846.
219. Sugden B, Warren N (1989) A promoter of Epstein-Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J Virol* 63: 2644-2649.
220. Ceccarelli DF, Frappier L (2000) Functional analyses of the EBNA1 origin DNA binding protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* 74: 4939-4948.
221. Li C, Ai LS, Lin CH, Hsieh M, Li YC, et al. (1998) Protein N-arginine methylation in adenosine dialdehyde-treated lymphoblastoid cells. *Arch Biochem Biophys* 351: 53-59.
222. Moriyama K, Yoshizawa-Sugata N, Obuse C, Tsurimoto T, Masai H (2012) Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1)-dependent recruitment of origin recognition complex (Orc) on oriP of Epstein-Barr virus with purified proteins: stimulation by Cdc6 through its direct interaction with EBNA1. *J Biol Chem* 287: 23977-23994.
223. Krysan PJ, Calos MP (1991) Replication initiates at multiple locations on an autonomously replicating plasmid in human cells. *Mol Cell Biol* 11: 1464-1472.
224. Eliopoulos AG, Stack M, Dawson CW, Kaye KM, Hodgkin L, et al. (1997) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* 14: 2899-2916.
225. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, et al. (1991)

- Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65: 1107-1115.
226. Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, Wang F, Dixit VM (1992) The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267: 24157-24160.
 227. Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, et al. (1994) Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 68: 5602-5612.
 228. Vockerodt M, Haier B, Buttgereit P, Tesch H, Kube D (2001) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology* 280: 183-198.
 229. Herbert KM, Pimienta G (2016) Consideration of Epstein-Barr Virus-Encoded Noncoding RNAs EBER1 and EBER2 as a Functional Backup of Viral Oncoprotein Latent Membrane Protein 1. *MBio* 7.
 230. Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M (2007) HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 17: 72-79.
 231. Reeves R, Edberg DD, Li Y (2001) Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 21: 575-594.
 232. Krude T, Christov CP, Hyrien O, Marheineke K (2009) Y RNA functions at the initiation step of mammalian chromosomal DNA replication. *J Cell Sci* 122: 2836-2845.
 233. Mohammad MM, Donti TR, Sebastian Yakisich J, Smith AG, Kapler GM (2007) Tetrahymena ORC contains a ribosomal RNA fragment that participates in rDNA origin recognition. *Embo j* 26: 5048-5060.
 234. Kirchmaier AL, Sugden B (1998) Rep*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus. *J Virol* 72: 4657-4666.
 235. Waltz SE, Trivedi AA, Leffak M (1996) DNA replication initiates non-randomly at multiple sites near the c-myc gene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res* 24: 1887-1894.
 236. Ermakova OV, Frappier L, Schildkraut CL (1996) Role of the EBNA-1 protein in pausing of replication forks in the Epstein-Barr virus genome. *J Biol Chem* 271: 33009-33017.
 237. Gahn TA, Schildkraut CL (1989) The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* 58: 527-535.
 238. Wang J, Lindner SE, Leight ER, Sugden B (2006) Essential elements of a licensed, mammalian plasmid origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 26: 1124-1134.
 239. Buerstedde JM, Takeda S (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67: 179-188.
 240. Huppert JL (2008) Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem Soc Rev* 37: 1375-1384.
 241. Lopes J, Piazza A, Bermejo R, Kriegsmann B, Colosio A, et al. (2011) G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. *Embo j* 30: 4033-4046.
 242. Sarkies P, Murat P, Phillips LG, Patel KJ, Balasubramanian S, et al. (2012) FANCDJ coordinates two pathways that maintain epigenetic stability at G-

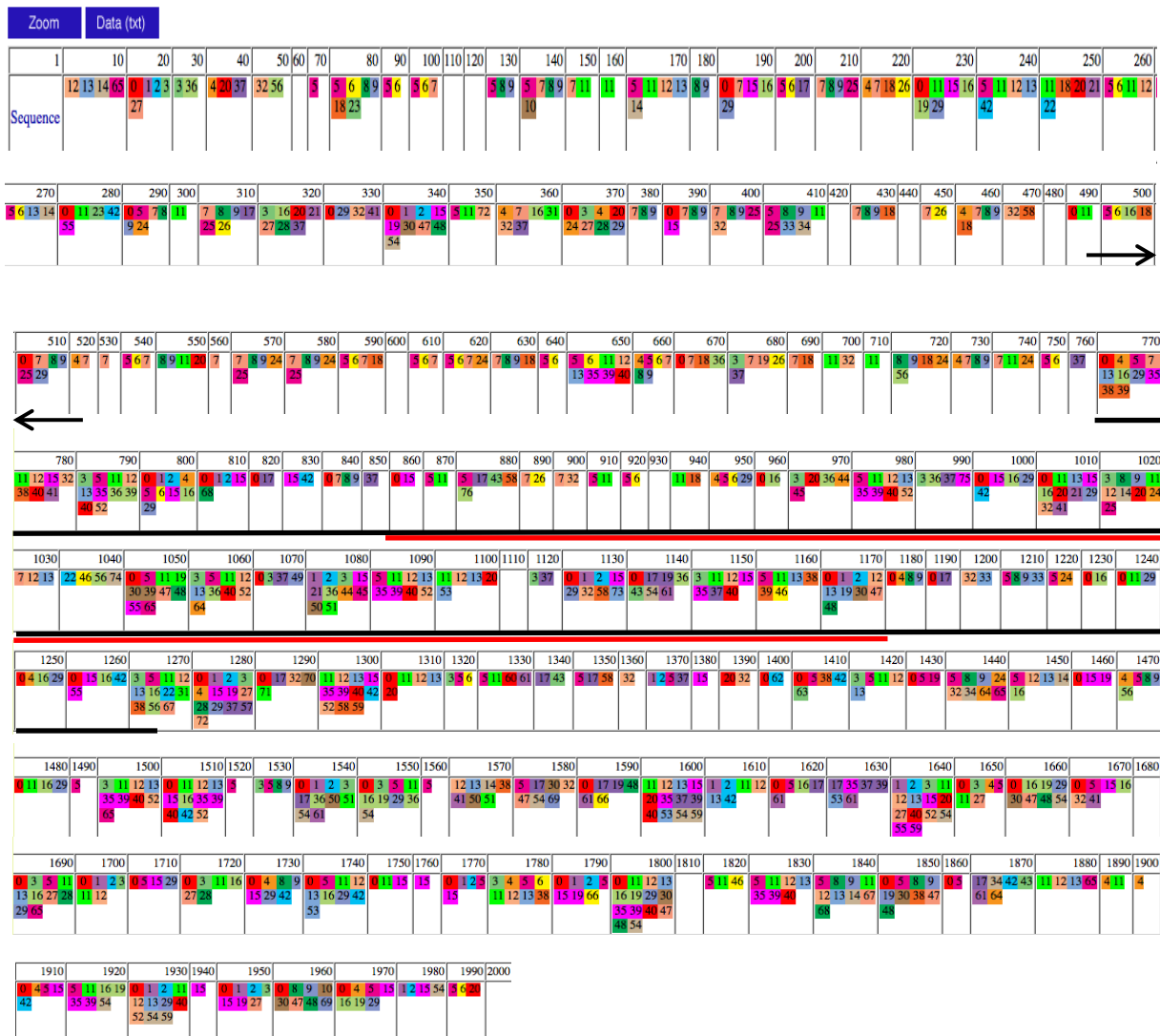
- quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res* 40: 1485-1498.
243. Haase SB, Calos MP (1991) Replication control of autonomously replicating human sequences. *Nucleic Acids Res* 19: 5053-5058.
 244. Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, et al. (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18: 333-334.
 245. Farre D, Roset R, Huerta M, Adsuara JE, Rosello L, et al. (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31: 3651-3653.
 246. Bellelli R, Castellone MD, Guida T, Limongello R, Dathan NA, et al. (2014) NCOA4 transcriptional coactivator inhibits activation of DNA replication origins. *Mol Cell* 55: 123-137.
 247. Knott SR, Peace JM, Ostrow AZ, Gan Y, Rex AE, et al. (2012) Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae*. *Cell* 148: 99-111.
 248. Zhou J, Chau CM, Deng Z, Shiekhatter R, Spindler MP, et al. (2005) Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *Embo j* 24: 1406-1417.
 249. Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat Chem* 5: 182-186.
 250. Biffi G, Di Antonio M, Tannahill D, Balasubramanian S (2014) Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat Chem* 6: 75-80.
 251. Liu X, Kraus WL, Bai X (2015) Ready, pause, go: regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. *Trends Biochem Sci* 40: 516-525.
 252. Kanoh Y, Matsumoto S, Fukatsu R, Kakusho N, Kono N, et al. (2015) Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nat Struct Mol Biol* 22: 889-897.
 253. Lombrana R, Almeida R, Alvarez A, Gomez M (2015) R-loops and initiation of DNA replication in human cells: a missing link? *Front Genet* 6: 158.
 254. Roberts RW, Crothers DM (1992) Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science* 258: 1463-1466.
 255. Ginno PA, Lim YW, Lott PL, Korf I, Chedin F (2013) GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res* 23: 1590-1600.
 256. Ginno PA, Lott PL, Christensen HC, Korf I, Chedin F (2012) R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol Cell* 45: 814-825.
 244. Yates JL, Camiolo SM (1988) Dissection of DNA replication and enhancer functions of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Cancer Cells* 6: 197-205

8. Anhang

8.1. Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen

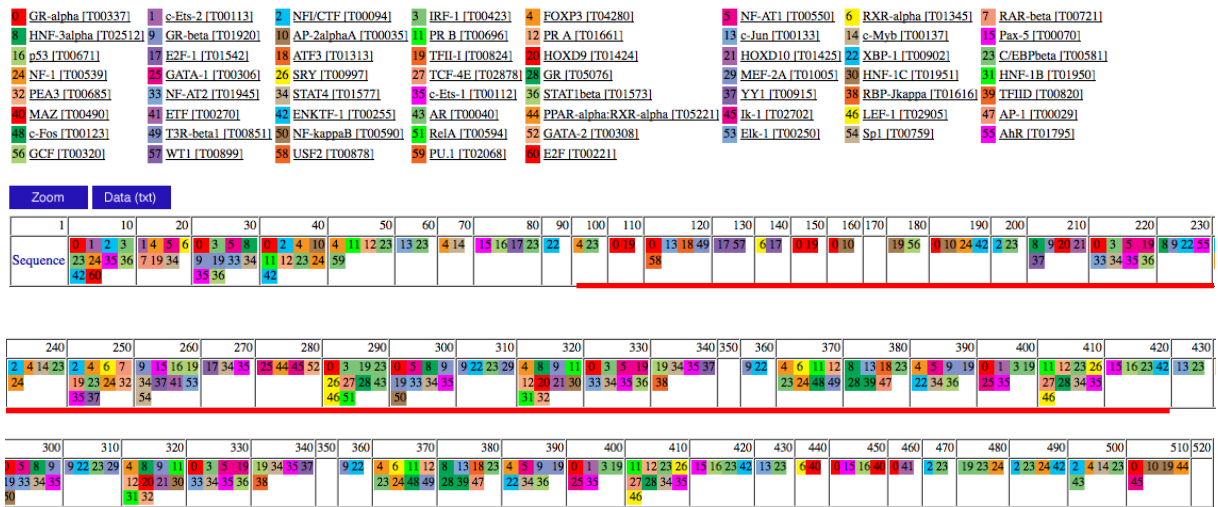
cc2 2 kb

1 C/EBPbeta [T00581]	1 PR B [T00696]	2 PR A [T01661]	3 GR-beta [T01920]	4 ENKTF-1 [T00255]	5 GR-alpha [T00337]	6 AP-2alphaA [T00035]	7 E2F-1 [T01542]
8 Pax-5 [T00070]	9 p53 [T00671]	10 EBF [T005427]	11 TFIL-1 [T00824]	12 STAT4 [T01577]	13 c-Ets-1 [T00112]	14 Elk-1 [T00250]	15 FOXP3 [T04280]
16 NF1/CTF [T00094]	17 c-Jun [T00133]	18 GCF [T00320]	19 GR [T05076]	20 YY1 [T00915]	21 PEA3 [T00685]	22 Ik-1 [T02702]	23 RAR-beta:RXR-alpha [T05420]
24 E1F [T00270]	25 Sp1 [T00759]	26 WT1 [T00899]	27 C/EBPalpha [T00105]	28 NF-Y [T00150]	29 NF-1 [T00539]	30 LEF-1 [T02905]	31 CTF [T00174]
32 RXR-alpha [T01345]	33 MAZ [T00490]	34 NF-kappaB1 [T00593]	35 STAT1beta [T01573]	36 HNF-3alpha [T02512]	37 XBP-1 [T00902]	38 c-Ets-2 [T00113]	39 IRF-1 [T00423]
40 NF-AT1 [T00550]	41 RAR-beta [T00721]	42 c-Myb [T00137]	43 ATF3 [T01313]	44 HOXD9 [T01424]	45 HOXD10 [T01425]	46 GATA-1 [T00306]	47 SRY [T00997]
48 TCF-4E [T02878]	49 MEF-2A [T01005]	50 HNF-1C [T01951]	51 HNF-1B [T01950]	52 NF-AT2 [T01945]	53 RBP-Jkappa [T01616]	54 TFIIID [T00820]	55 AR [T00040]
56 PPAR-alpha:RXR-alpha [T05221]	57 POU2F1 [T00641]	58 T3R-beta1 [T00851]	59 NF-AT1 [T01948]	60 POU2F2 (Oct-2.1) [T00646]	61 AP-1 [T00029]	62 VDR [T00885]	63 RXR-1:RXR-alpha [T05671]
64 NF-kappaB [T00590]	65 RelA [T00594]	66 HNF-4alpha [T03828]	67 ELF-1 [T01113]	68 PU.1 [T02068]	69 TCF-4 [T02918]	70 ER-alpha [T00261]	71 RAR-alpha1 [T00719]
72 AhR:Arnt [T05394]	73 c-Fos [T00123]	74 GATA-2 [T00308]	75 AhR [T01795]	76 USF2 [T00878]			



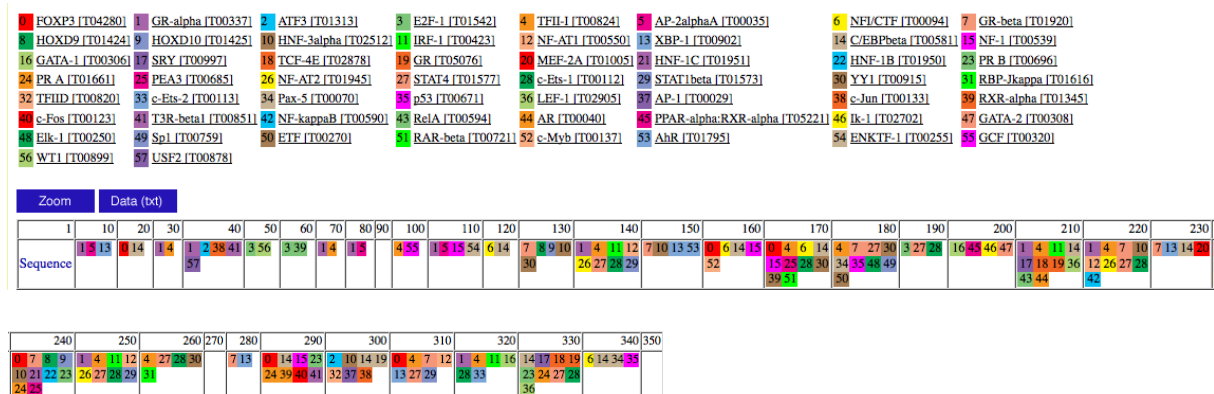
906 Bindestellen

cc2 500 bp



321 Bindestellen

cc2 330 bp



164 Bindestellen

Abb. 9: Vorhersage der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (TF) in cc2 2 kb, cc2 500 bp und cc2 330 bp unter Verwendung der PROMO 3.0 Software [244,245]. Identifizierte TF wurden durchnummeriert und mit einem Farbcode und die Position der potentiellen Bindestellen in der jeweiligen Sequenz gekennzeichnet. Schwarz bzw. rot unterlegte Bereiche kennzeichnen die cc2 500 bp bzw. die cc2 330 bp Sequenz von cc2. Die Anzahl der Bindestellen für die jeweilige Sequenz ist angegeben.

8.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Katharina Damaschke
Geburtsdatum: 9. April 1985
Geburtsort: Limburg an der Lahn
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

03/2012 – 01/2016: Promotion in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Aloys Schepers,
Abteilung Genvektoren, Helmholtz-Zentrum München

Vortrag: “Potential role of EBV-specific EBER1 in mediating the interaction between EBNA1 and the origin recognition complex”

University Medical Center, Amsterdam
Europäische Epstein-Barr-Virus Konferenz

04/2009 – 09/2011: Master Biochemie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

10/2005 – 03/2009: Bachelor Chemie und Biochemie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Schule

1995 - 2004: Anne Frank Gymnasium Erding

1992 – 1994 Grundschule Grüner Markt, Erding

1991 – 1992 Grundschule Vohburg a. d. Donau

8.3. Eidesstattliche Versicherung

Damaschke Julia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Bedeutung von G-Quadruplex Strukturen für die Definition und Effizienz von Replikationsursprüngen.“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen grades eingereicht wurde.

München den 10.05.2016

Julia Damaschke

8.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützend begleitet haben.

Mein erster Dank gilt meinem Betreuer **PD. Dr. Aloys Schepers**, der stets eine offene Tür für jeden hatte und mich mit Rat und Tat während meiner Promotion unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkolleginnen des „Schepers Racing Team“ für die wertvolle Zeit, die wir zusammen sowohl in der Arbeit als auch privat miteinander verbracht haben. Für das Diskutieren über unserer Projekte, für die gegenseitige Unterstützung, für die vielen gemeinsamen Lacher und Singeinlagen sage ich Danke liebe **Nina, Steffi, Sarah, Kris, Petra und Lara!**

Auch bei allen Menschen der **Abteilung Genvektoren und des „2. Stocks“** des Haemaotologikums möchte ich mich recht herzlich für die angenehme kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

Ein sehr bedeutungsvoller Dank gilt **meiner lieben Familie, meinem Freund Florian und Familie Büddefeld**, die mich immer unterstützt, mich motiviert und mir viele Momente geschenkt haben, in denen ich Kraft für die Doktorarbeit aufladen konnte. Danke **Lilly und Tim**. Ihr wart und seid die besten Motivatoren für mich!